Aus dem Institut für Klinische Physiologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Hierholzer

MORPHOLOGIE, ENZYMAKTIVITÄT UND NA^+-AUFNAHME VON MEMBRANVESIKELN AUS TUBULUSZELLBÜRSTENSÄUMEN DER RATTENNIERE NACH ADRENALEKTOMIE UND ALDOSTERONSUBSTITUTION

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Reiser
aus Augsburg
und
Jan Weber
aus München

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0038

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Hierholzer

MORPHOLOGIE, ENZYMAKTIVITÄT UND NA^+-AUFNAHME VON MEMBRANVESIKELN AUS TUBULUSZELLBÜRSTENSÄUMEN DER RATTENNIERE NACH ADRENALEKTOMIE UND ALDOSTERONSUBSTITUTION

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Reiser
aus Augsburg
und
Jan Weber
aus München

Referent: Prof. Dr. R. Kirsten

Korreferent: Prof. Dr. H.-W. Reinhardt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25. 11. 1985

PRÄAMBEL

Die vorliegende Arbeit ist eine Gemeinschaftsarbeit. Da die gegenwärtige Promotionsordnung fordert, daß aus einer solchen Gemeinschaftsarbeit Einzelleistungen ersichtlich sein müssen, haben wir die Arbeit wie folgt aufgeteilt:

Von Frau Reiser stammen die Kapitel 2, 3.1 - 3.4, 3.8, 4.1, 4.2, 5.1 - 5.3, 5.6 und 5.7.

Herr Weber schrieb die Kapitel 1, 3.5 - 3.7, 4.3, 5.4, 5.5 und 6.

Das Kapitel 4.4 und das Literaturverzeichnis wurden gemeinsam erarbeitet.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	7
2.	LITERATURÜBERSICHT	9
2.1	Bürstensaummembranvesikel	9
2.2	Aldosteron	11
2.2.1	Wirkung von Aldosteron am Organismus	11
2.2.2	Angriffspunkte von Aldosteron an der Niere ...	12
2.2.3	Biochemische Wirkungen von Aldosteron an der Nierentubuluszelle	13
3.	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Versuchstiere und Versuchsvorbereitung	18
3.1.1	Adrenalektomie	18
3.1.2	Fütterung und Tränkung	19
3.2	Membranpräparation	19
3.3	Vesikellyse	22
3.4	Mikroskopie	22
3.5	Enzymbestimmung	23
3.5.1	Alkalische Phosphatase EC 3.1.3.1	24
3.5.2	Saure Phosphatase EC 3.1.3.2	24
3.5.3	Lactat-Dehydrogenase EC 1.1.1.27	25
3.5.4	Glucose-6-Phosphatase EC 3.1.3.9	25
3.5.5	Citrat-Synthase EC 4.1.3.7	26
3.5.6	Gesamt-ATPase, Mg^{2+}-ATPase EC 3.6.1.3 und Na^{+}-K^{+}-ATPase EC 3.6.1.4	26
3.5.7	Proteinbestimmung	27
3.6	Inkubation	28
3.6.1	Minutenbereich	29
3.6.2	Sekundenbereich	32
3.7	Radioaktivitätsmessung	35
3.7.1	Exkurs Strahlenschutz	39

Seite

3.8	Auswertung	40
4.	ERGEBNISSE	43
4.1	Adrenalektomieerfolg	43
4.2	Mikroskopie	45
4.2.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM) Microvilli .	45
4.2.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM) Membranvesikel	46
4.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TM)	48
4.2.3.1	Triton-X-100-behandelte Membranen	51
4.3	Enzymaktivitäten der Präparation	53
4.3.1	Alkalische Phosphatase	53
4.3.2	Saure Phosphatase	53
4.3.3	Lactat-Dehydrogenase	62
4.3.4	Glucose-6-Phosphatase	62
4.3.5	Citrat-Synthase	62
4.3.6	Gesamt ATPase, Mg^{2+}-ATPase, Na^{+}-K^{+}-ATPase	63
4.3.7	Proteinbestimmung	63
4.4	Intravesikuläre Na^{+}-Aufnahme	64
4.4.1	Kinetik der Na^{+}-Aufnahme in Membranvesikel ...	64
4.4.2	Einfluß von pH-Veränderungen	67
4.4.3	Temperatureinfluß	73
4.4.4	Einfluß von Triton-X-100	73
5.	DISKUSSION	80
5.1	Wirksamkeit von Aldosteron am Organismus	80
5.2	Membrancharakterisierung durch Elektronenmikroskopie	80
5.3	Membranvesikellyse durch Triton-X-100	81
5.4	Membranuntersuchung durch enzymatische Analyse	82
5.4.1	Bürstensaummembran	82
5.4.2	Lactat-Dehydrogenase	85
5.4.3	Na^{+}-K^{+}-ATPase	87

Seite

5.5 Kinetik der Natrium-Aufnahme 94
5.5.1 Intravesikuläres Volumen 94
5.5.2 Intravesikuläre Na^+-Konzentration 95
5.5.3 Natrium-Fluß 97
5.5.4 Gegentransport 100
5.6 Einfluß verschiedener Na^+-Protonen-Gradienten auf die Natrium-Aufnahme 103
5.7 Einfluß des Aldosterons auf die Natrium-Aufnahme der Bürstensaummembranvesikel 106

6. ZUSAMMENFASSUNG 110

7. LITERATURVERZEICHNIS 111

8. ANHANG 131

1. EINLEITUNG

Die Niere ist im Organismus des Säugetiers das wichtigste Organ für die Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Salz- und Wasserhaushalts. Dabei wirken sowohl hormonale extrarenale wie autoregulatorische intrarenale Faktoren zusammen. Durch renale Resorptions- und Exkretionsvorgänge werden Abweichungen von der Homöostase korrigiert.

In der Niere erfolgt die Rückgewinnung der mit dem Primärharn ausgeschiedenen Elektrolyte durch die Tubuluszellen, die die Harnkanälchen auskleiden (DEETJEN (18)). Die Zellwand der Tubuluszelle ist nicht einheitlich, sondern weist zwei morphologisch und funktionell unterscheidbare Regionen auf (ANDREWS (1)). Die an das Interstitium grenzende Zellmembran wird basal-laterale, die dem Harnstrom zugewandte wird apikale Membran genannt. Die apikale Membran ist gekennzeichnet durch viele ins Tubuluslumen hineinreichende Microvilli (Zellwandausstülpungen). Diese mit Microvilli versehenen Membranen heißen auch 'Bürstensäume'.

Die Isolierung von Bürstensaummembranen aus Nierenhomogenat ermöglicht eine genauere Untersuchung dieses Teils der Tubuluszellwand (WILFONG (127)). Unter geeigneten Bedingungen schließen sich bei der Präparation der Bürstensaummembranen die Membranfragmente zu Vesikeln zusammen (MURER (83)). Nach Inkubation der Membranvesikel und anschließender Mikrofiltration können die Vesikelbestandteile mit einer Methode von CRANE (17) untersucht werden und so Aufschluß über einige Membrantransportvorgänge geben.

Für das Nebennierenrindenhormon Aldosteron, das die tubuläre Rückresorption eines Teils des filtrierten Natriums reguliert, wird eine Wirkung auf die apikale Tubuluszellwand vermutet (MARVER (77)). Die vorliegende Arbeit soll den

Einfluß von Aldosteron auf die Bürstensaummembran prüfen. Als Versuchstiere dienten Ratten, die durch Adrenalektomie hormondepriviert waren (KIRSTEN (65)). Nach Aldosterongabe wurden aus den Nieren dieser Ratten die apikalen Tubuluszellwände als Bürstensaummembranvesikel isoliert. Die Membranen wurden elektronenoptisch dargestellt und in ihrer Enzymaktivität bestimmt. Der Natrium-Transport in die Vesikel wurde durch Inkubation mit radioaktivem Natrium, anschließender Mikrofiltration der natriumbeladenen Vesikel und Bestimmung der intravesikulären Radioaktivität untersucht.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Bürstensaummembranvesikel

Microvilli sind fingerförmige Plasmafortsätze, die bei den verschiedensten Zellarten in sehr wechselnder Zahl vorkommen. Ihre Länge beträgt bis zu mehreren µm, ihr Durchmesser bis zu 100 nm. Sie bilden an den resorbierenden Epithelien, z.B. Niere, Darm, Plexus chorioideus, einen so dichtstehenden Rasen, daß dieser schon lichtmikroskopisch erkannt werden kann und von diesem Bild seinen Namen 'Bürstensaummembran' bekam. In der Niere ist dieser Bürstensaum im proximalen Tubulus zu finden, wobei die Dichte der Microvilli im Übergang zur Henleschen Schleife abnimmt. In der Henleschen Schleife verschwinden sie ganz, und im distalen Tubulus sind elektronenmikroskopisch nur kurze Microvilli festzustellen (WALLRAFF (122)).

1961 gelang MILLER (81) erstmals die Isolierung und elektronenoptische Darstellung von Bürstensaummembranen aus Hamsterdünndarm. 1968 stellte THUNEBERG (118) Microvillimembranen vom proximalen Konvolut des Kaninchens dar und KINNE (56) belegte 1969 mit morphologischen und biochemischen Daten die Reinheit der von ihm isolierten Rattennierenmicrovilli. Die oben genannten Präparationen wurden mit einem Zuckergradienten als Trennmedium durchgeführt. 1970 berichtete STECK (117), daß sich Membranen im Dichtegradienten gemäß ihrer Ladung, der Oberflächenspannung und der osmotischen Balance zu Vesikeln geformt trennen. Dieser Vorgang ist mathematisch beschreibbar. Die Trennung der erwünschten Membranen von den restlichen Zellbestandteilen mit dem oben erwähnten Zuckergradienten ist ein aufwendiges und langwieriges Verfahren, das sehr viel Ausgangsmaterial benötigt. Die Ausbeute beträgt ca. 0,5% des Ausgangsmaterials bei einem Anteil von 90% Microvilli (WILFONG (127)). HEIDRICH

(38) versuchte 1972 eine Trennung der Bürstensäume von allen weiteren, in der Präparation enthaltenen Zellfragmenten und -organellen durch 'free flow'-Elektrophorese unter Ausnutzung der unterschiedlichen Oberflächenladungen, konnte aber nicht die gleiche Trennschärfe wie mit dem Dichtegradienten erreichen.

Einen Fortschritt brachte die von BOOTH (12) 1974 veröffentlichte Methode der Microvillidarstellung. Sie beruht auf der Aggregation von Zellfragmenten und -organellen mit zweiwertigen Metallionen. Wie die Elektronenmikroskopie zeigt, sind geringfügige Verunreinigungen vorwiegend auf Lysosomen zurückzuführen. Der wesentliche Vorteil dieser Methode liegt in der Kürze der benötigten Präparationszeit von ca. 3,5 Stunden. Untersuchungen zur Orientierung und Dichtigkeit der Membranvesikel durch WALTER (123) ergaben, daß 75% der Vesikel normal orientiert und dicht sind, 20% die eigentlich dem Zellinnern zugewandte Membranseite nach außen gewandt haben und ein Rest von 5% der Vesikel keine geschlossene Membran aufweist.

Zahlreiche Substanzen wie Glucose (HOPFER (42)), Phenylalanin (EVERS (26)), l-Alanin und Phosphat (KINNE (55)) wurden auf ihre Aufnahme in die Bürstensaummembranvesikel von Niere und Dünndarm verschiedener Tierarten unter den verschiedensten Versuchsbedingungen untersucht. Zur Messung der intravesikalen Substrataufnahme wurde eine Filtrationsmethode, zur Substratkennzeichnung die Isotopenmarkierung verwendet. Bei MURER (83) wurde die Bürstensaumpräparation von Rattendünndarm ebenfalls mit der Ca^{++}-Fällung und Differentialzentrifugation vorgenommen. Mit den so gewonnenen Vesikeln wies MURER nach, daß unter Na^{+}-Zugabe eine meßbare pH-Verschiebung im Inkubationsmedium im Sinne einer Azidifikation stattfindet. Dieser Befund führte zur Annahme eines

'Na^+/H^+-Antiport'-Systems in der untersuchten Vesikelmembran.

2.2 Aldosteron

1855 beschrieb ADDISON ein Krankheitsbild, als dessen Ursache sich eine primäre Nebennierenrindeninsuffizienz herausstellte. 1926 berichtete LUCAS von Blut- und Urinbefunden bei Hunden nach Adrenalektomie: sie wiesen eine erhöhte Natrium- und verminderte Kalium-Ausscheidung auf sowie eine Hyperkali- und Hyponatriämie. In den dreißiger Jahren führte LOEB (73) die tödlichen Verläufe bei kompletter Nebennierenrindeninsuffizienz auf den renalen Natriumverlust zurück. In den sechziger Jahren konnte das dafür hauptverantwortliche Mineralocorticoid Aldosteron chromatografisch dargestellt werden. Seitdem radioaktive Substanzen als biologische Tracer eingesetzt wurden, konnten Wirkmechanismen, auch der des Aldosterons, verfolgt werden.

2.2.1 Wirkung von Aldosteron am Organismus

Mit einer Dosis von 2 µg Aldosteron pro 100 g Körpergewicht (KIRSTEN (65)) ist bei adrenalektomierten Ratten nach einer Latenzperiode von 30 bis 90 Minuten (LUDENS (75); FIMOGNARI (33)) eine optimale Antwort des Organismus zu bewirken, gemessen am Na^+/K^+-Quotienten im Urin (EDELMAN (25); SHARP (104)). Der maximale Effekt tritt 2 bis 3 Stunden nach Hormongabe ein; nach 5 bis 6 Stunden ist mit dem völligen Verschwinden der Wirkung zu rechnen (LUDENS (75)). Bei o.g. Dosis erreicht man 80% der überhaupt mit Aldosteron auszulösenden Wirkung, wobei bei unphysiologisch hohen Dosen über 10 µg pro 100 g Körpergewicht die Gefahr besteht, unspezifische steroidale Effekte auszulösen.

2.2.2 Angriffspunkte von Aldosteron an der Niere

Eines der wesentlichsten Zielorgane von Aldosteron ist die Niere. Es liegen kontroverse Befunde vor, in welchen Abschnitten des Nephrons die oben beschriebenen Elektrolytverschiebungen geregelt werden.

In indirekten Studien beschrieb NICHOLSON (85) den proximalen und SONNENBLICK (112) den distalen Tubulus als Hauptwirkort des Hormons. 1966 fand HIERHOLZER (40) in Mikropunktionsstudien, daß sich die Aldosteronwirkung nicht nur auf den distalen Tubulus erstreckt, sondern im proximalen Konvolut eine durch Adrenalektomie provozierbare, mit Aldosteron wieder aufhebbare Verdoppelung der Resorptionszeit zu beobachten ist, die jedoch auf die Bilanz der Natrium-Ausscheidung keinen Einfluß zu haben scheint. Dies könnte damit erklärt werden, daß bei Wegfall der Aldosteronwirkung am proximalen Tubulus nicht allein der Antrieb der Natrium-Resorption wegfällt, sondern gleichzeitig und im gleichen Ausmaß der passive Rückstrom von Natrium in die Tubulusflüssigkeit gehemmt wird. Für beide Wirkungen des Aldosterons gibt es experimentelle Belege an Krötenblase und Froschhaut (DEETJEN (18)). Bei HIERHOLZER (40) zeigte sich eine Abnahme der absoluten Natrium-Rückresorption im proximalen Tubulus auf die Hälfte des Normalwerts nach Adrenalektomie, die durch Aldosterongabe normalisiert werden konnte. Die Transit-Zeit blieb hier auch nach Hormongabe verlängert. WIEDERHOLT (126) berichtete ebenfalls von einem Anstieg der Transportkapazität des proximalen Tubulus für Natrium 60 Minuten nach einer Aldosterongabe, während andere Autoren nach einmaliger Gabe eine Wirkung auf den Na^+/K^+-Quotienten, nicht aber im proximalen Tubulus fanden (LUDENS (75)).

2.2.3 Biochemische Wirkungen von Aldosteron an der Nierentubuluszelle

Der biochemisch-physiologische Weg, über den das Hormon in und an der Zielzelle seine Wirkung entfaltet, ist ebenfalls nicht eindeutig geklärt. Ausgehend von Kurzschlußstromexperimenten an der Bufo-marinus-Blase stellte EDELMAN (25) 1963 die Hypothese auf, daß Aldosteron sich an der Epithelzelle lokalisiert, dort eine de-novo-Proteinsynthese bewirkt und dies(e) Protein(e) als Enzym(e) die für einen aktiven Natrium-Transport erforderliche Energie bereitstellt(en).

Für solch einen indirekten Wirkungsmechanismus von Aldosteron sprechen:

a) die Latenzperiode von 30 bis 90 Minuten bis zum Wirkungseintritt,
b) die Befunde von FANESTIL (28), daß 30 Minuten nach Hormongabe die maximale Substratanreicherung im Nierengewebe vorliegt, zwei Stunden später aber, also zum Zeitpunkt der maximalen Nettowirkung auf Natrium und Kalium, nur noch 10% in der Niere zu finden sind,
c) die Befunde von FANESTIL (28) und AUSIELLO (3), die mit Hilfe des radioaktiv markierten Hormons in Säugetierzellen Rezeptoren für Aldosteron feststellen konnten. In weiteren Untersuchungen konnte ROUSSEAU (94) diese Aldosteron-bindenden Proteine (ABPs) isolieren und im Zellkern und Zytosol nachweisen.

Die ABPs lassen sich in drei Gruppen unterteilen, die sich in ihrer Affinität Aldosteron gegenüber unterscheiden, wobei in physiologischer Konzentration alle drei Arten Aldosteron binden können.

ABP I ist vor allem mineralocorticoid, ABP II und III sind vor allem glucocorticoid ansprechbar. ABP II hat die stärk-

ste Affinität zu Dexamethason, ABP III zu Corticosteron, und Aldosteron steht bei beiden an dritter Stelle. Prinzipiell besteht eine kompetitive Hemmbarkeit zwischen Glucocorticoiden und Aldosteron, sowie zwischen Aldosteron und Antimineralocorticoiden wie z.B. Spironolacton. Die Molekulargewichte der ABPs liegen zwischen 50000 und 150000 (LUDENS (74; 75)). Die ABPs lassen sich in zwei Gruppen, die Tris-extrahierbaren und KCl-extrahierbaren ABPs, unterscheiden. Beide Gruppen sind ineinander überführbar (EDELMAN (23)).

MARVER (78; 79) entwickelte ein Modell, nach dem sich Aldosteron mit dem Zytoplasma-ABP zu einem aktiven Komplex verbindet, der sich zum Tris-löslichen nucleären ABP transformiert und dort an das Chromatin gebunden wird. Dieses Modell gilt für alle Steroide (FELDMAN (32)).

Für diese Induktionshypothese spricht die Hemmbarkeit der Aldosteronwirkung durch die Transskriptionshemmer Actinomycin D und Puromycin, sofern die Substanzen zeitlich so gegeben werden, daß die Bindung der Hemmstoffe vor der Chromatinbindung des nucleären ABP stattfinden kann (EDELMAN (25); WILLIAMSON (128); LUDENS (76)). Glucophenylalanin kann dosisabhängig ebenfalls die Aldosteronwirkung hemmen.

Gegen die Induktionstheorie als Hauptwirkmechanismus von Aldosteron spricht die Tatsache, daß die RNA-Polymerase erst nach drei Stunden ansteigt, zu einer Zeit, in der bereits die maximale Hormonwirkung zu finden ist. Sie bleibt bis zu zwölf Stunden erhöht, ohne daß noch ein Effekt auf den Elektrolythaushalt festzustellen ist.

Es bleibt zunächst offen, ob die vermutete de-novo-Proteinsynthese eine primäre oder sekundäre Hormonwirkung ist.

Der physiologische Mechanismus der Aldosteron-induzierten Natrium-Rückresorption vom Tubuluslumen durch die Nierenzelle ins Blut ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Natrium-Rückresorption erfolgt gegen einen elektrochemischen Gradienten, der im Tubulusverlauf immer größer wird. Normalerweise ist die Na^+-Konzentration im distalen Tubulus auf 25% des Plasmawertes erniedrigt. Sie steigt bei adrenalektomierten Ratten im Mittel auf 50% und mehr an (DEETJEN (18)). Unter welchen Bedingungen die Natrium-Resorption stattfindet, ob durch aktiven Transport, durch erleichterten passiven Transport oder durch eine Kombination dieser Mechanismen, ist weitgehend ungeklärt. Das von KOEFOLD-JOHNSEN und USSING (68) und SKOU (106) entwickelte Ussing-Skou-Modell der Aldosteronzielzelle legt drei mögliche Funktionstheorien dar:

1. Die Pumpentheorie:
   An der basal-lateralen Zielzelle sind Natriumpumpen lokalisiert, deren Anzahl oder Transportkapazität durch Aldosteron erhöht wird.
   Hierfür sprechen Untersuchungsergebnisse von GOODMAN (34), der an der Krötenblase nachweisen konnte, daß Phospholipide der basal-lateralen Membran durch Aldosteron verändert werden. Es ist denkbar, daß eine Strukturänderung der Membran, in der die Natriumpumpen eingebettet liegen, deren Aktivität steuert und auf diesem Weg das Hormon zur Wirkung kommt.

2. Die Permeasetheorie:
   Durch Aldosteron ausgelöste Veränderungen an der lumenzugewandten Membran der Zielzelle erleichtern den passiven Eintritt von Natrium in die Zelle.
   SHARP (104; 105), LIPTEN (72) und LEAF (70) fanden bei Untersuchungen mit Na^+-Isotopen an Einzelzellen unter Aldosteron-Einfluß einen höheren passiven Eintritt von

Natrium in die Zelle als bei Parallelversuchen ohne Aldosteron. Auch kinetische Studien von CRABBÉ (16) über den Natrium-Pool an der Krötenblase bestätigen einen erleichterten passiven Transport von Natrium unter Aldosteron-Einfluß.

3. Die Energietheorie:
Durch eine Aldosteron-induzierte ATP-Anreicherung wird mehr Energie für eine energieabhängige Natriumpumpe bereitgestellt.
Versuche von FANESTIL (30) mit Entzug oder Zugabe oxidierbarer Substanzen unter Aldosteronwirkung an der Krötenblase sprechen für eine erhöhte Energiebereitstellung durch Aldosteron. KIRSTEN (60; 61; 64; 65) führte Untersuchungen zur Hemmbarkeit bzw. Induzierbarkeit von Schlüsselenzymen des Citratcyclus durch Aldosteron, Spironolacton und Cortisol an Rattennieren durch. Es zeigte sich eine Induktion dieser Schlüsselenzyme durch Aldosteron, nicht jedoch durch seinen Antagonisten und das Glucocorticoid. Die Glucose-1-PO_4-Oxidation und die Bereitstellung von cAMP unter Aldosteron wurde sowohl an Amphibien als auch an Säugetieren belegt (KIRCHBERGER (59); UHLICH (119); BECKMAN (6)). Dagegen fand SHARP (104; 105) in hormonbehandelten Zellen nicht mehr ATP als in Kontrollen. SNART (110) fand zwar zunächst einen erhöhten O_2-Verbrauch in der isolierten Krötenblase 60 bis 90 Minuten nach Zugabe von Aldosteron, konnte bei Versuchen an isolierten Nierenscheiben jedoch keine signifikante Änderung des O_2-Verbrauchs feststellen.

Die Interpretation der vielfältigen und zum Teil widersprüchlich erscheinenden Befunde ist durch folgende Tatsachen erschwert: die Studien bedienen sich Zellverbänden oder Einzelzellen verschiedener Spezies und verschiedenster Untersuchungsmethoden. Dadurch ist eine direkte Vergleich-

barkeit der Ergebnisse häufig nicht gegeben. Die Übertragung von an Amphibienorganen gewonnenen Erkenntnissen auf die Verhältnisse am Säugetier und letztlich am Menschen ist mit größter Vorsicht vorzunehmen. Der Wirkungsmechanismus von Aldosteron ist höchstwahrscheinlich multifaktoriell. Rückkoppelungsmechanismen und Summationseffekte von verschiedenen Einzelprozessen sind nicht leicht aufzudecken.

KIRSTEN (60) gibt zur Interpretation seiner Befunde zu bedenken, daß die gefundenen Veränderungen unter Aldosteron beim Condensing-Enzyme für eine Energiebereitstellung aus dem Zitronensäurezyklus zum Natriumtransport sprechen kann. Umgekehrt jedoch könnte diese Energiebereitstellung auch sekundär durch einen erhöhten Zellnatriumgehalt induziert sein. Zudem ist ungeklärt, ob die Erhöhung der Enzymaktivitäten auf die Aufhebung einer Aktivitätshemmung oder auf eine erhöhte Netto-Proteinsynthese zurückzuführen sind.

MARVER (77) stellte die Frage, ob alle Aldosteronwirkungen rezeptorgebunden sind. Der Vorgang der Erhöhung der Natriumpermeabilität der lumenzugewandten Membran ist durch Amilorid und Amphotericin simulierbar, durch Proteinsynthesehemmer jedoch nicht blockierbar. Gleichzeitig kann Natrium selbst ATP hydrolisieren und damit selbst limitierende Substanz für die Natriumpumpfunktion in den Extrazellulärraum bzw. ins Blut sein.

Die Möglichkeit, den Einfluß von Aldosteron nicht mehr nur am Gesamtorganismus oder an der intakten Einzelzelle zu untersuchen, sondern an relevanten subzellulären Einheiten, verspricht neuen Zugang zur komplexen Wirkungsweise des Hormons.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere und Versuchsvorbereitung

Alle Versuche wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt, die am Versuchstag zwischen 170g und 220g schwer waren. Die Tiere wurden den Versuchsgruppen streng zufällig zugeteilt.

a) Normalgruppe: 79 unbehandelte Tiere
b) Aldosterongruppe ('Aldo'): 202 adrenalektomierte Ratten, denen drei Stunden vor Tötung einmalig Aldosteron (Aldocorten, Fa. CIBA, Basel) s.c. in die Rückenhaut injiziert wurde (MARVER (77); EDELMAN (24)). Das Aldosteron wurde mit NaCl 0,9% verdünnt auf 5 µg/ml. Die applizierte Dosis betrug 0,05 µg/g KG (KIRSTEN (65)).
c) Kontrollgruppe ('Kontrolle'): 202 adrenalektomierte Ratten, denen drei Stunden vor Tötung in gleicher Art gleiches Volumen physiologischer Kochsalzlösung ohne Aldosteron injiziert wurde. Die Tötung aller Tiere erfolgte durch Nackenschlag.

3.1.1 Adrenalektomie

Fünf bis elf Tage vor dem Experiment erfolgte die Adrenalektomie (SEGER (102)): In Halothan-Narkose wurde ein dorsaler Medianschnitt ausgeführt. Von dort aus wurde auf beiden Seiten die Niere aufgesucht. Unter sorgfältiger Schonung des Parenchyms erfolgte dann die vollständige Exstirpation der Nebenniere samt Kapsel. Die Wunde wurde durch Klammerung geschlossen.

3.1.2 Fütterung und Tränkung

Alle Tiere hatten freien Zugang zu einer Ratten-Standarddiät (Altromin R, Fa. Altromin) mit einem Durchschnittsgehalt von 0,25% Na^+ und 0,6% K^+. Die adrenalektomierten Ratten erhielten ab dem Zeitpunkt der Operation 0,9%ige NaCl-Lösung zur Tränkung. Zuvor hatten sie ebenso wie die Normalgruppe freien Zugang zu Leitungswasser ad libitum.

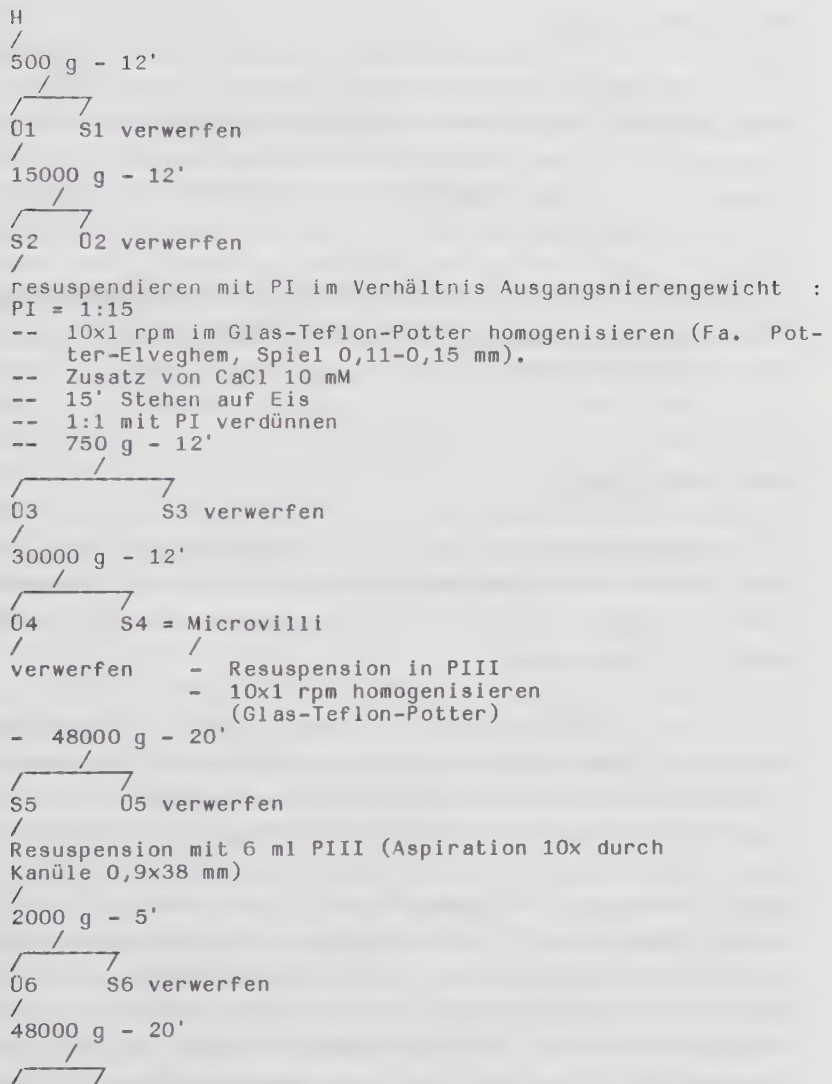
Zur Kontrolle der Adrenalektomie und Aldosteronsubstitution wurde den Tieren unmittelbar nach der Tötung durch Blasenpunktion Urin entnommen. Die Elektrolyte im Harn wurden mit einem Flammenphotometer (Flame Photometer 12343, Fa. Instrumentation) gemessen.

3.2 Membranpräparation

Die Präparation der Bürstensaummembran-Vesikel aus den Rattennieren wurde nach der Methode von EVERS (26) vorgenommen. Dieses Verfahren ist eine Kombination von fraktionierter Zentrifugation und Calcium-Ausfällung der Membranen:

1. Tötung der Ratten durch Nackenschlag.
2. Präparation der Nieren und Einbringen in eisgekühltes Homogenisationsmedium (Mannit 10 mM, TRIS/HCl 2 mM, pH 7,1); weitere Präparation auf Eis.
3. Dekapsulierung und Entfernung von Nierenbecken, Binde- und Fettgewebe.
4. Zerkleinerung mit Rasierklinge.
5. Wägung und Herstellung einer 10%igen Suspension mit dem Homogenisationsmedium.
6. 2'Homogenisation (Homogenisator '23', Fa. Virtis).
7. Ca-Zugabe zu 10 mM Lösung.
8. 15' Stehen auf Eis.

9. Verdünnung 1:1 mit Ca-Puffer (Mannit 10 mM, TRIS/HCl 2 mM, CaCl 10 mM, pH 7,1).
10. Zentrifugation nach Schema (Zentrifuge Superspeed RC 5, Fa. Sorvall; Rotoren GSA bzw. SS 34).


H
500 g - 12'
Ü1 S1 verwerfen
15000 g - 12'
S2 Ü2 verwerfen
resuspendieren mit PI im Verhältnis Ausgangsnierengewicht :
PI = 1:15
-- 10x1 rpm im Glas-Teflon-Potter homogenisieren (Fa. Potter-Elveghem, Spiel 0,11-0,15 mm).
-- Zusatz von CaCl 10 mM
-- 15' Stehen auf Eis
-- 1:1 mit PI verdünnen
-- 750 g - 12'
Ü3 S3 verwerfen
30000 g - 12'
Ü4 S4 = Microvilli
verwerfen
- Resuspension in PIII
- 10x1 rpm homogenisieren (Glas-Teflon-Potter)
- 48000 g - 20'
S5 Ü5 verwerfen
Resuspension mit 6 ml PIII (Aspiration 10x durch Kanüle 0,9x38 mm)
2000 g - 5'
Ü6 S6 verwerfen
48000 g - 20'
Ü7 S7 = Vesikel
verwerfen
H = Homogenat
Ü = Überstand
S = Sediment
PI = Homogenisationsmedium
PII = Ca-Puffer (s. Text)
PIII = Mannit 100 mM, TRIS/HEPES 20 mM, pH 7,4

3.3 Vesikellyse

Die gewonnenen Membranvesikel prüften wir auf die Geschlossenheit ihrer Membran, indem wir eine mit Triton-X-100 lysierte und damit undichte Membranfraktion als Kontrollgruppe herstellten (HOUSLAY (44)). Triton-X-100 ist ein nichtionisches Detergens, das sich mit der Lipiddoppelschicht einer biologischen Membran verbindet. Das keilförmige Molekül bildet mit den Lipiden der Membranoberfläche Lipid-Detergens-Micellen mit kleinem Radius und zerstört durch die Herauslösung der Lipide die Membranstruktur.

3.4 Mikroskopie

Die Präparationen von Microvilli und Membranvesikeln wurden durch Transmissionselektronenmikroskopie (OHNESORGE (86); HABERMEHL (35)) und Rasterelektronenmikroskopie (ANDREWS (1)) untersucht.

Die Fixierungsschritte waren zunächst für alle Membranen identisch. Vom Substrat wurden pro Präparat 50 µl entsprechend 500 µg abgenommen und in Glutaraldehyd 3% fixiert. Mit Cacodylpuffer wurde der pH auf 7,3 eingestellt. Die Lösung war mit 400 mosm - zur Vermeidung osmotisch bedingter Läsionen - optimal zur Fixierung biologischen Materials (BURECK (14); REIMER (92)). Anschließend wurde mit Osmiumtetroxid kontrastiert. Ab diesem Präparationsstadium wurden die transmissionselektronenmikroskopischen Präparate vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Steglitz weiterbearbeitet. Die rasterelektronenmikroskopischen Präparate wurden anschließend mehrmals durch Zentrifugation in Aqua bidest. ausgewaschen (Schwingzentrifuge 320, Fa. Eppendorf). Von der so gewonnenen Proteinsuspension wurde ein Tropfen auf einen mit Klebefolie bestückten Präparatehalter aufge-

bracht. Durch Gefrierschock (OHNESORGE (86)) wurden die Präparate getrocknet und entwässert (Gefriertrockner, Fa. Heräus). Mit Hilfe des Gerichtsmedizinischen und des Geologischen Instituts der Freien Universität führten wir dann die Gold-Kegelbedampfung der Präparate und die Bilderstellung am Rasterelektronenmikroskop durch.

3.5 Enzymbestimmung

In den Membranpräparationen wurde die Aktivität der folgenden acht Enzyme bestimmt: Alkalische Phosphatase, Saure Phosphatase, Lactat-Dehydrogenase, Glucose-6-Phosphatase, Citrat-Synthase sowie die Gesamt-ATPase, Mg^{2+}-ATPase und Na^{+}-K^{+}-ATPase. Der Vergleich von Enzymaktivitäten in Membranen adrenalektomierter Tiere mit und ohne Aldosteron-Substitution diente der Aufklärung einer Hormonwirkung auf diese Enzyme.

Durch das Enzymprofil lassen sich weitere intra- und extrazelluläre Schritte ableiten (SOLYOM (111)). Eine Anreicherung oder Verminderung der Markerenzyme ermöglicht Angaben über Reinheit bzw. Kontamination mit unerwünschten Zellbestandteilen in einer Membranpräparation (ARCHAKOV (2)).

Die Bestimmung der Citrat-Synthase wurde mit einem Cary-Recording-Spectrometer (Fa. Applied Physics Corporation, USA), die restlichen Enzymtests mit einem Eppendorf-Photometer mit Schreiber durchgeführt. Für die Bestimmungen, die am Versuchstag durchgeführt werden mußten (Alkalische Phosphatase, Saure Phosphatase, Lactat-Dehydrogenase, Glucose-6-Phosphatase), wurden die Proben im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Hierbei sind keine Aktivitätsverluste zu erwarten (BERGMEYER (8)). Für die Bestimmung von Citrat-Synthase und ATPasen wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff

tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt untersucht. Die Aktivität der Citrat-Synthase bleibt nach SRERE (115) in gefrorenem Zustand monatelang stabil. Zur Situation der ATPasen s. Diskussion Enzyme, Abschnitt 5.4.3.

3.5.1 Alkalische Phosphatase EC 3.1.3.1

Die Alkalische Phosphatase wurde am Versuchstag mit einem handelsüblichen Schnelltest 'monotest Alkalische Phosphatase opt.' (Fa. Boehringer, Mannheim) bestimmt.

Testprinzip:

$$\text{p-Nitrophenylphosphat} \xrightarrow[\text{Phosphatase}]{\text{alkalische}} \text{Phosphat} + \text{p-Nitrophenol}$$

Gemessen wird die Extinktionszunahme bei 405 nm durch die Bildung des p-Nitrophenols. Die Inkubationstemperatur war 25°C, der Inkubations-pH betrug 9,8.

3.5.2 Saure Phosphatase EC 3.1.3.2

Die Saure Phosphatase wurde am Versuchstag mit einem handelsüblichen Test 'Test-Combination Saure Phosphatase' (Fa. Boehringer, Mannheim) bestimmt.

Testprinzip:

$$\text{p-Nitrophenylphosphat} \xrightarrow[\text{Phosphatase}]{\text{saure}} \text{Phosphat} + \text{p-Nitrophenol}$$

Gemessen wird die Extinktionszunahme bei 405 nm durch die Bildung des p-Nitrophenols. Inkubationstemperatur war 37°C (thermostatgeregeltes Wasserbad), der Inkubations-pH betrug 4,8.

3.5.3 Lactat-Dehydrogenase EC 1.1.1.27

Die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase wurde am Versuchstag bestimmt mit einem handelsüblichen Schnelltest 'monotest LDH opt.' (Fa. Boehringer, Mannheim).

Testprinzip:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xleftrightarrow[\text{Dehydrogenase}]{\text{Lactat-}} \text{Lactat} + \text{NADH}^+$$

Gemessen wird die Extinktionsabnahme bei 340 nm durch Bildung des NAD^+. Inkubationstemperatur war 25°C, der Inkubations-pH betrug 7,5.

3.5.4 Glucose-6-Phosphatase EC 3.1.3.9

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase wurde am Versuchstag bestimmt nach der Methode von BAGINSKI (4).

Testprinzip:

$$\text{Glucose-6-Phosphat} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{Phosphatase}]{\text{Glucose-6-}} \text{Glucose} + \text{P}_i$$

Gemessen wird das freigesetzte Phosphat als gefärbter Phosphat-Molybdat-Komplex bei 840 nm. Inkubationstemperatur war 37°C (thermostatgeregeltes Wasserbad) und der Inkubations-pH betrug 6,5.

3.5.5 Citrat-Synthase EC 4.1.3.7

Die Aktivität der Citrat-Synthase wurde bestimmt nach der Methode von KOSICKI (69) und SRERE (113; 114).

Testprinzip:

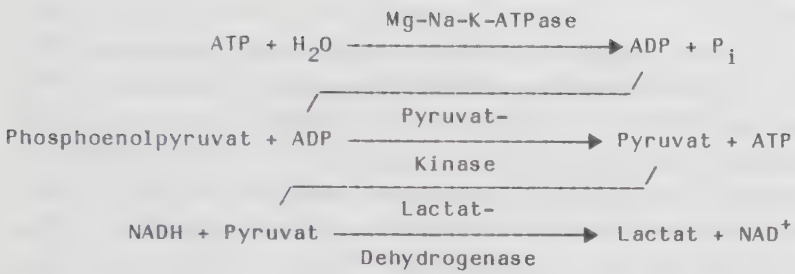
Acetyl-CoA + Oxalacetat + Dinitrodithiobenzoat (DTNB) + H_2O ←,
/ Citrat-Synthase /
→ Citrat + CoA-S-Nitrothiobenzoat + Mercaptid + H^+

Gemessen wird das durch die Spaltung des DTNB freigesetzten Mercaptid bei 412 nm. Inkubationstemperatur war 25°C, der Inkubations-pH betrug 8,1.

3.5.6 Gesamt-ATPase, Mg^{2+}-ATPase EC 3.6.1.3 und Na^+-K^+-ATPase EC 3.6.1.4

Es wurden in zwei Arbeitsgängen die Gesamt- (Mg^{2+}, Na^+, K^+)-ATPase und die nach Ouabainhemmung verbleibende Mg^{2+}-ATPase nach der Methode von KIRSTEN (63) bestimmt. Die Na^+-K^+-ATPase wurde als Ouabain-hemmbarer Anteil der ATPase-Aktivität berechnet.

Testprinzip:



Gemessen wird die Extinktionsabnahme bei 340 nm durch Bildung des NAD^+. Die Inkubationstemperatur betrug 25°C, der Inkubations-pH war 7,2.

3.5.7 Proteinbestimmung

Das Membranprotein wurde mit der Biuret-Methode nach BEISENHERZ (7) bestimmt.

Testprinzip:

Polypeptid + NaOH + $CuSO_4$ + Biuret ⟶ gefärbter Komplex

Es wird die Extinktion des blauen Farbstoffes bei 546 nm gemessen. Mit dem Biuret-Faktor werden die Eiweißkonzentrationen ermittelt.

3.6 Inkubation

Über die gesamte Versuchsdauer wurde die Vesikelsuspension in eisgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Die Inkubation wurde durch Zugabe der Vesikel zum Inkubationsmedium gestartet. An sechs Zeitpunkten nach Inkubationsbeginn wurde eine Probe des Inkubats entnommen. Die Natriumaufnahme der Vesikel in der Probe wurde durch sofortige Mikrofiltration gestoppt. Die Inkubation mit Vesikeln einer Präparation wurde viermal hintereinander durchgeführt, so daß für jeden Zeitpunkt ein Mittelwert aus vier Meßwerten gebildet werden konnte.

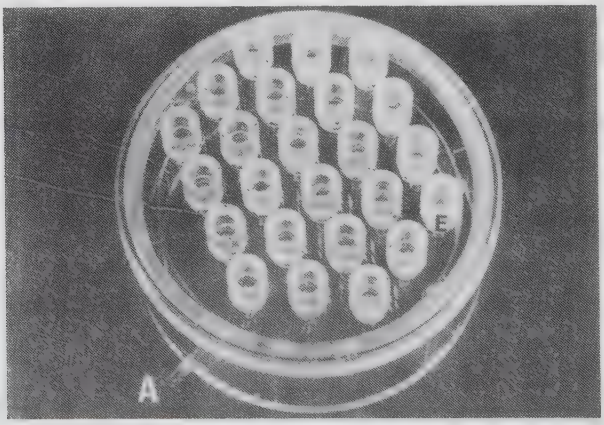


Abb. 1: Filtriergerät mit 24 Einsätzen für Millipore-Filter (gebaut in der Technischen Abteilung des Universitäts-Klinikums Steglitz, Berlin)
E = abschraubbarer Einsatz zum Einlegen von Millipore-Filtern
A = Anschlußstück zur Saugpumpe

Wir verwendeten für die Versuche insgesamt sechs Filtriergeräte mit je 24 Filtereinsätzen (s.Abb. 1). Die Filter hatten eine Porengröße von 0,45 µm (Fa. Millipore S.A., Molsheim, Frankreich). Die Filtergeräte wurden den Inkubationsreihen gleichmäßig nach dem Permutationsprinzip zugeordnet, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch unterschiedliche Filtriereigenschaften einzelner Geräte zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde auch die Belegung der 24 Filtereinsätze eines jeden Gerätes von Versuch zu Versuch variiert.

Im gesamten Versuchsablauf setzten wir die Membranvesikel drei Inkubationslösungen aus:

1. dem Puffer Gamma, in dem die Präparation erfolgte (100 mM Mannit, 20 mM TRIS/HEPES).
2. dem radioaktiv markierten Inkubationsmedium Beta. Der Stammlösung (100 mM Mannit, 50 mM Na_2SO_4, 50 mM TRIS/HEPES (300 mOsm)) wurden je nach Versuchsumfang 20 bis 50 µl entsprechend 20 bis 50 µCi Na-22 zugefügt (carrierfree, Fa. Amersham-Buchler). Dem Inkubationsmedium wurden jeweils drei Referenzwerte für die spätere Auswertung entnommen.
3. dem Spülpuffer Alpha, mit dem die Inkubation beendet wurde (100 mM Mannit, 100 mM MgCl, 50 mM Na_2SO_4, 10 mM TRIS/HEPES (460 mOsm)).

Der pH-Wert dieser Lösungen wurde im Bereich der physiologischen Urinansäuerung bzw. -alkalisierung in Abhängigkeit vom Versuchsplan variiert. Die pH-Schritte Gamma/Beta/Alpha/ sind in der Abb. 22 zusammengestellt.

3.6.1 Minutenbereich

Für den Versuchsaufbau zur Messung der Natriumaufnahme zwischen fünfzehn Sekunden und sechs Minuten wurde pro Inku-

bationsreihe ein Inkubationsgefäß aus nicht benetzbarem Kunststoff mit 1200 µl Inkubationsmedium Beta gefüllt und mit einem kleinen teflonbeschichteten Magneten gerührt. Die Vesikel-Stammlösung Gamma wurde kurz mit einem Laborrüttler resuspendiert. Für den Start der Inkubation wurden 200 µl Gamma mit einer Eppendorf-ipette entnommen und in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Inkubation wurde durch Entnahme von jeweils 200 µl Suspension beendet. Die Zeitmessung für die Entnahme wurde mit einer Stoppuhr durchgeführt. Das Inkubat wurde auf das vorgefeuchtete Millipore-Blättchen pipettiert und sofort mit 4 ml eiskaltem Puffer Alpha gespült. Der Versuchsablauf ist in der Abb. 2 schematisch dargestellt.

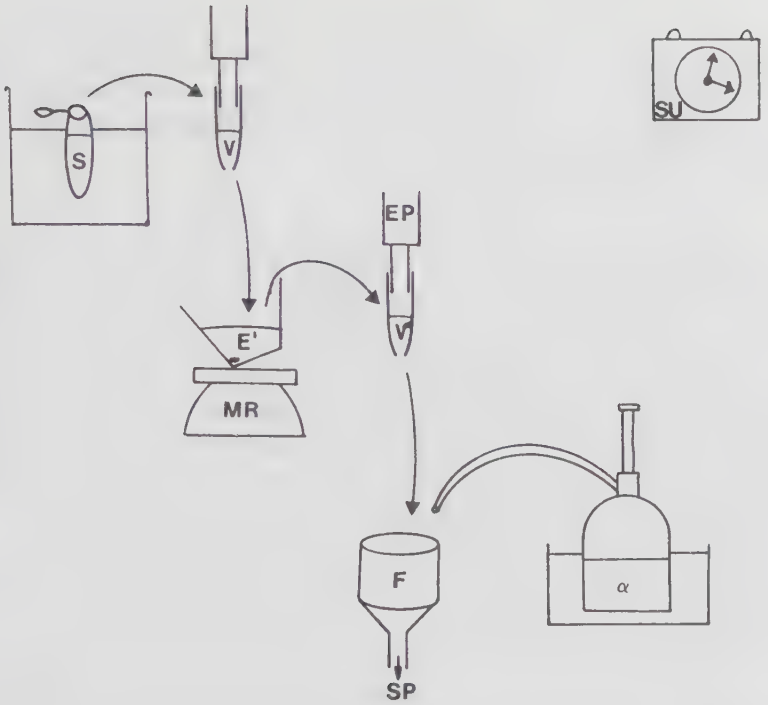


Abb. 2: Schema der Inkubationsmethode für den Minutenbereich

S = Vesikelstammlösung in Eiswasser
V = Vesikel 200 µl
ß = radioaktive Inkubationslösung 1200 µl
V' = Inkubat 200 µl
F = Millipore-Filter
α = Spülpuffer in Eiswasser
EP = Eppendorf-Pipette
MR = Magnetrührer
SP = Saugpumpe
SU = Stoppuhr

3.6.2 Sekundenbereich

Nach Auswertung der unter Punkt 3.6.1 beschriebenen Methode wurde es notwendig, die Messung in kürzeren Inkubationsintervallen vorzunehmen. Es wurde eine Methode entwickelt, die es gestattet, Inkubationen im Zeitraum von zwei bis zwölf Sekunden durchzuführen.

Die Inkubation wurde durch Zugabe von 100 µl Vesikelsuspension zu 700 µl Inkubationsmedium Beta gestartet. Später wurden 150 µl Vesikelsuspension und 750 µl Beta verwendet, um einen zusätzlichen Meßpunkt zu gewinnen. Das Inkubat wurde sofort vollständig in eine 2,5 ml-Hamilton-Spritze aufgezogen, die dadurch zum Reaktionsgefäß wurde. Nach Verwerfen der ersten 100 µl-Portion wurde im Zwei-Sekunden-Abstand, ab Reaktionsbeginn, jeweils 100 µl Inkubat auf die vorgefeuchteten Millipore-Filter pipettiert und mit 4 ml eiskaltem Puffer Alpha nachgespült. Als Zeitgeber diente ein Metronom (Fa. Taktell) mit 60 Schlägen pro Minute. Der Aufbau ist schematisch in Abb. 3 wiedergegeben.

Um die vollständige Durchmischung der beiden Reaktionspartner Vesikelsuspension und Inkubationsmedium Beta in der Hamilton-Spritze zu testen, wurde folgender Versuch durchgeführt: Zu 750 µl Aqua dest. wurden 150 µl Methylrot in einer Hamilton-Spritze aufgezogen. Die Lösung wurde nicht auf die Filter, sondern in Eppendorf-Gefäße pipettiert. Anschließend wurde ihre Extinktion bei 405 nm im Photometer (Fa. Eppendorf) bestimmt. Abb. 4 gibt einen Überblick über den Verlauf der Extinktionswerte für drei Versuchsreihen.

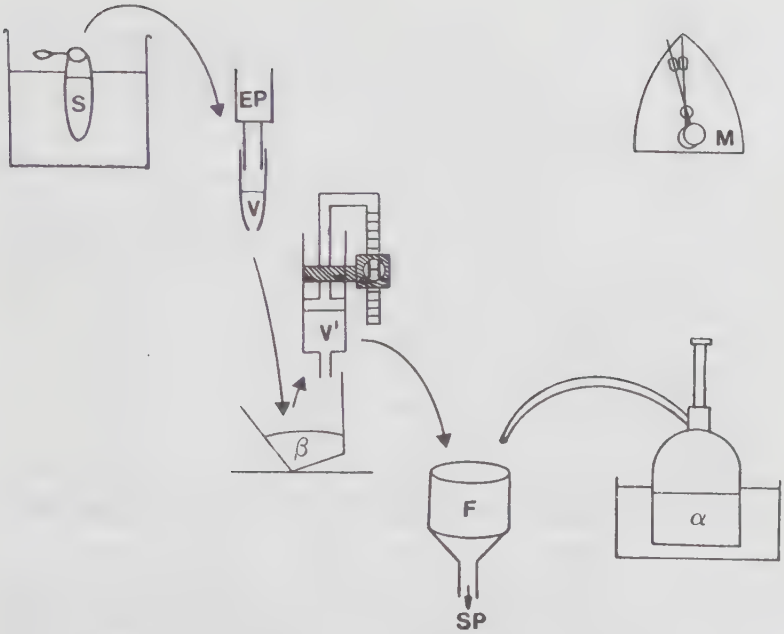


Abb. 3: Schema der Inkubationsmethode für den Sekundenbereich

S = Vesikelstammlösung in Eiswasser
V = Vesikel 100 µl
ß = radioaktive Inkubationslösung 700 µl
V´ = Inkubat 800 µl
F = Millipore-Filter
α = Spülpüffer in Eiswasser
EP = Eppendorf-Pipette
H = Hamilton-Spritze 2,5 ml
SP = Saugpumpe
M = Metronom

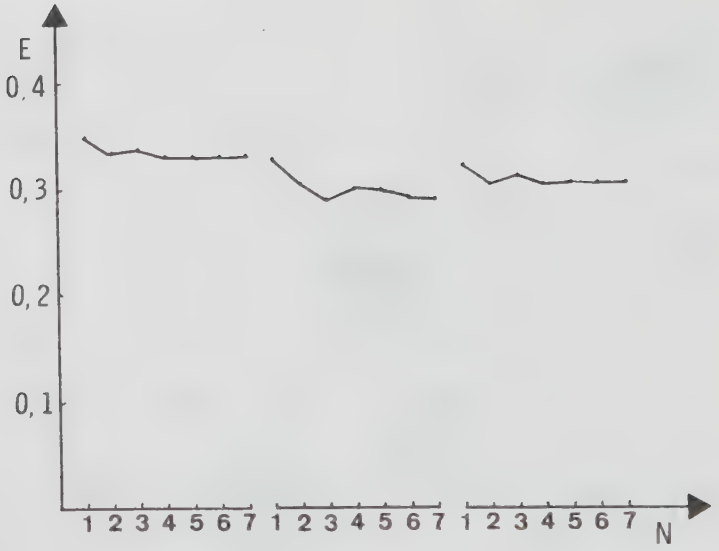


Abb. 4: Untersuchung der Durchmischung einer Inkubationslösung von Methylrot und Aqua dest. in der Hamilton-Spritze in Abhängigkeit vom auspipettierten Volumen.
E = Extinktion der Probe
N = Nr. der Pipettierung

Die Extinktionen der jeweils ersten 100 µl sind höher als die der folgenden Volumina, deren Mittelwerte ± Standardabweichungen 0,333±0,0029, 0,295±0,0060 und 0,305±0,0025 betragen und eine Variation in der Größenordnung von 1-2% aufweisen. Die höhere Extinktion läßt sich durch die fehlende Durchmischung der im Spritzenkonus verbleibenden Lösung erklären. Aus diesem Grund wurden bei den Inkubationen die ersten 100 µl der Hamilton-Spritze verworfen. In einer anderen Serie bestimmten wir die Genauigkeit der von der Hamilton-Spritze abgegebenen Volumina durch Wägung der pipettier-

ten '100 µl'-Portionen. Tab. 1 zeigt das Ergebnis dieser Messungen.

Tab. 1: Gewichte aufeinander folgender '100 µl'-Portionen von Aqua dest. bei drei Pipettierreihen mit der Inkubations-Hamilton-Spritze (µg)

Versuchsreihe:	1	2	3
fortlaufende Pipettierung (µl)			
100	84,6	91,6	96,8
200	95,7	98,6	98,4
300	99,0	93,9	91,5
400	93,4	99,2	94,2
500	89,4	93,0	101,0
600	103,0	95,7	
700	92,7	102,6	
Mittelwert je 100 µl	94,0	96,4	96,5
S.D.	5,6	3,6	3,5

Bei den Pipettierungen bestand eine ausreichende Genauigkeit mit einem durchschnittlichen Volumenfehler von 4%.

3.7 Radioaktivitätsmessung

Nach Abschluß der Inkubationsreihen eines Versuchstages wurden die Filtergeräte demontiert und die Millipore-Filter in vornummerierte Gamma-Zählröhrchen eingebracht. Anschliessend erfolgte die Zählung im Gamma-Zähler (Gammaszint BF 5300, Fa. Berthold). Na-22 weist neben der Gamma-Strahlung auch einen β^+-Zerfall mit einer Maximalenergie von 0,54 MeV auf (HAMMER (36)). In Vorversuchen wurden die mit Na-22

inkubierten Membranen im Gamma-Zähler gemessen. Anschließend wurde mit 2 ml Ethylenglykolmonoethylether solubilisiert und nach Zugabe von 8 ml Szintillationslösung (Aquasol, Fa. New England Nuclear) der ß-Zerfall mit einem Tri-Carb-Szintillationszähler gemessen. Abb.5 zeigt die Zählraten einer Inkubationsreihe als Korrelationsdiagramm der 60 Meßwerte. Bei gleicher Zählausbeute von Gamma- und Betazählung ließ sich durch Wegfall der Schritte Solubilisierung und Szintillatorzusatz ein Rationalisierungseffekt erzielen. Aus diesem Grund wurde die Radioaktivitätsmessung mit einem Gammazähler durchgeführt. Bei der Bestimmung mit einem Gammazähler fehlt die Beeinflussung durch Autoabsorption bzw. Quenching (KERR (52)) des zu zählenden Materials, was ebenfalls einen Vorteil darstellt.

Zur Durchführung der Gammazählung erstellten wir zunächst ein Energiespektrum des Na-22 für das zu benutzende Gerät. Im gesamten Meßbereich von 0 bis 2 MeV wurde die Aktivität einer Na-22-Probe bestimmt (s. Abb. 6). Als optimale Zählereinstellung wurde der Bereich von 500 bis 1700 keV ermittelt.

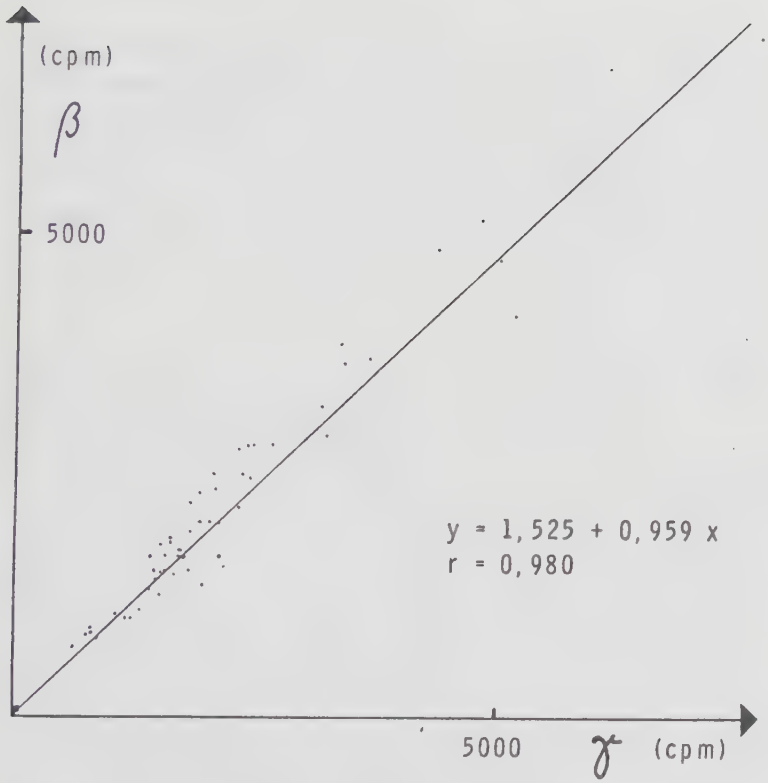


Abb. 5: Korrelationsdiagramm einer vergleichenden Zählung von 60 Proben im Gamma- und Beta-Zähler. cpm = Zählimpulse pro Minute

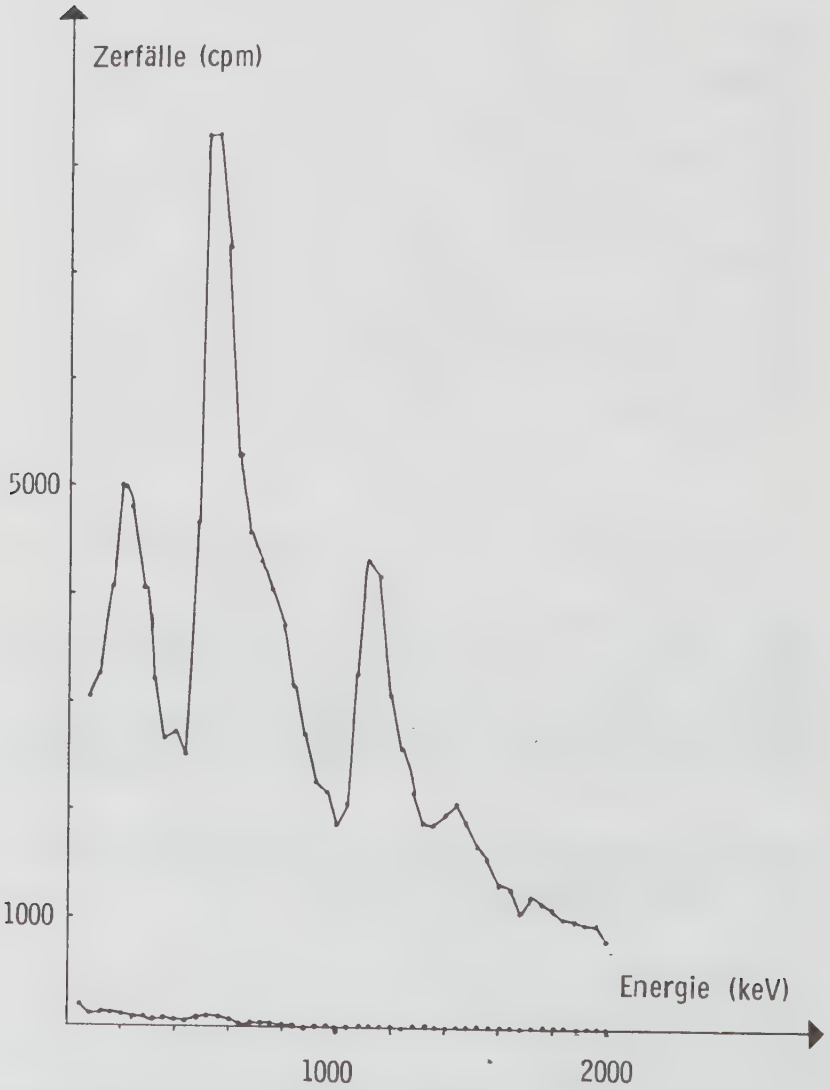


Abb. 6: Energiespektrum von Na-22 im Gamma-Zähler Berthold Gammaszint BF 5300 (obere Kurve) und Leerwertspektrum des Zählers (untere Kurve).

3.7.1 Exkurs Strahlenschutz

Wir verwendeten eine Gesamtaktivität von ca. 1,6 mCi des harten Gamma-Strahlers Na^{+}-22 (E_{γ} = 1,38 MeV; Γ = 1,19 mR·m^2/h.mCi). Bei rund 5 Stunden Dauer des nuklearmedizinischen Versuchsteils incl. Auf- und Abbau und etwa 50 Versuchstagen entspricht dies einer möglichen Expositionsdauer von 250 Stunden. Die Strahlenbelastung errechnet sich nach

$$\dot{D} = \Gamma_{Na\text{-}22} \cdot A/r^2 \qquad (1).$$

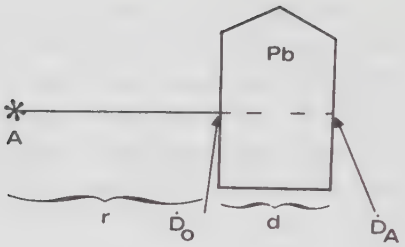
Dabei ist
D = Dosisleistung (mR/h)
A = Aktivität der Strahlungsquelle (mCi)
r = Abstand von der Strahlungsquelle (m)

Bei Abschirmung wird die Strahlung exponentiell geschwächt gemäß

$$\dot{D}_A = \dot{D}_o \cdot e^{-\mu' \cdot d \cdot \rho} \qquad (2)$$

mit
$\dot{D}_o$, $\dot{D}_A$ = Dosisleistung vor und nach Abschirmung
μ' = Flächenbelegung = 0,0518 cm^2/g (Pb; 1,5 MeV)
ρ = Dichte = 11,3 g/cm^3 (Pb)
d = Schichtdicke der Abschirmung (5 cm bei üblicher Bleimauer)

Die Tab. 2 gibt einen Überblick über die Dosisleistungen der bei den einzelnen Versuchen verwendeten Aktivitäten und Arbeitsabstände (s. Skizze):



Tab. 2: Modellrechnung für Strahlenbelastung bei verschiedenen Aktivitätsmengen von Na-22

Aktivität (µCi)	$\dot{D}_o$ (mR/h) r=10 cm	$\dot{D}_o$ (mR/h) r=20cm	$\dot{D}_A$ (mR/h) r=10cm mit Bleimauer
5	0,6	0,15	0,03
10	1,2	0,30	0,06
50	6,0	1,5	0,30
120	14	3,6	0,77
500	60	15	3,2

3.8 Auswertung

Eine Versuchsserie bestand aus mehreren Einzelversuchen (n) mit identischen Versuchsbedingungen. Pro Versuch wurden sechs mal vier Meßwerte in counts per minute (cpm) bestimmt.

Werte mit einem Zählfehler über 10% und solche, die nach dem Chauvenet-Kriterium ausschieden, wurden nicht berücksichtigt:

Zählfehlerstatistik nach MAUSHART (80):

$A_{min} = k/s \cdot \sqrt{n_o/t}$

A_{min} = Nachweisgrenze ($\mu Ci/cm^2$)

s = Oberflächenansprechvermögen ($\mu Ci/cm^2$)

n_o = Nulleffektimpulsrate (s^{-1})

k = 1

angenommener Background: 700 cpm

Chauvenet-Kriterium nach BREWER (13):

"kritisches Verhältnis" $P = X/\sigma_n$

$X = n-x_n$

N = größter Wert der Zählreihe

x_n = Mittelwert der Zählreihe der Menge n

σ_n = Standardabweichung der Menge n

Jeder Versuch wurde in Vierfachbestimmung durchgeführt. Aus den jeweils vier Meßwerten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet, der n=1 darstellte.

Die ermittelten cpm-Werte für die verschiedenen Zeitpunkte wurden in nVal Natrium pro mg aufgebrachtes Membranprotein umgerechnet: 1 cpm = X/YxZ

X = Na-Konzentration der Inkubationslösung (nVal/l)

Y = Radioaktivität der Inkubationslösung (cpm)

Z = Proteinkonzentration der Inkubationslösung (mg Prot/ml)

Es wurden Aufnahmekurven in nVal Na^+/mg Prot. in Abhängigkeit von der Zeit aufgestellt. Die graphischen Darstellungen sind Summenkurven aus den Mittelwerten vergleichbarer Versuche, deren Anzahl durch n bezeichnet ist. Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind in der Legende beschrieben (Abb. 18-21, 23-27).

Mit dem Subgruppen-Rangsummentest nach WILCOXON-van-ELTERN (71) wurden vergleichbare Summenkurven in Hinblick auf ihre Signifikanz untersucht.

4. ERGEBNISSE

4.1 Adrenalektomieerfolg

Zur Kontrolle der Wirksamkeit von Adrenalektomie und korrekter Aldosteronsubstitution auf den Organismus wurde jeder Ratte unmittelbar nach der Tötung Urin durch Blasenpunktion entnommen. Der Harn wurde flammenphotometrisch auf seinen Na^+- und K^+-Gehalt untersucht. Die Na^+-Rückresorption in der Niere wird nicht nur vom Mineralocorticoidspiegel im Blut, sondern auch in hohem Ausmaß von schwankenden Größen wie Extrazellulärvolumen und glomerulärer Filtrationsrate beeinflußt. Deshalb ist es sinnvoll, nicht Absolutwerte, sondern den Na^+/K^+-Quotienten im Urin als Index der Wirksamkeit von Adrenalektomie und Aldosterongabe zu benutzen (FIMOGNARI (33)). Nach Injektion von Mineralocorticoiden ist eine Latenzperiode von 30 bis höchsten 120 Minuten zu erwarten (LUDENS (76); FIMOGNARI (33); SHARP (105)). Der maximale mineralocorticoide Effekt tritt nach 2 bis 3 Stunden auf (LUDENS (75); KINNE (57)). Deshalb wurde die Urinentnahme zum Zeitpunkt der Tötung vorgenommen, d.h. 3 Stunden nach Hormonsubstitution. In Tab. 3 sind die Na^+/K^+-Quotienten im Rattenurin angegeben.

Tab. 3: Na^+/K^+-Quotienten im Rattenurin

Gruppe	Na^+/K^+	S.E.M.	(n)
Normal	0,69	0,05	7
Aldo	0,26	0,05	18
Kontrolle	1,01	0,08	18

Normal = Normaltiere
Aldo = Adrenalektomierte, aldosteronbehandelte Ratten
Kontrolle = Adrenalektomierte Ratten
n = Anzahl der Bestimmungen

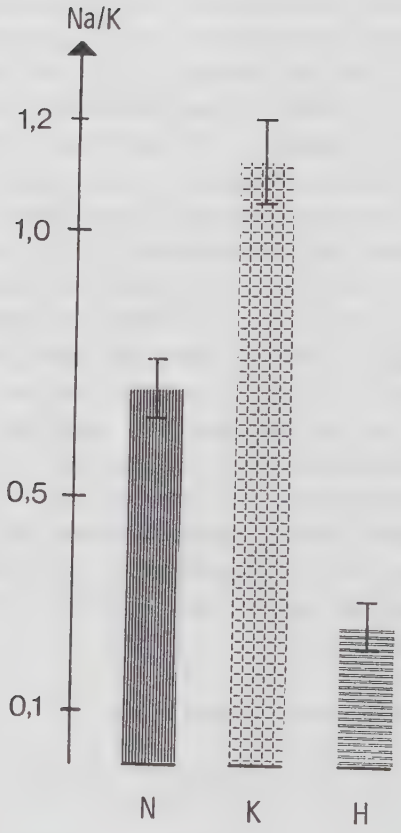


Abb. 7: Na^+/K^+-Quotienten im Rattenurin
N = Normaltiere
K = Adrenalektomierte Ratten
H = Adrenalektomierte, aldosteronbehandelte Ratten
S.E.M. beidseitig aufgetragen

Bei der Kontrollgruppe der adrenalektomierten Ratten findet man den größten Na^+/K^+-Quotienten mit 1,01. Der Quotient der aldosteronbehandelten Gruppe liegt mit 0,26 noch unter dem der Normalgruppe (0,69). Diese Verhältnisse sind in Abb. 7 graphisch dargestellt.

4.2 Mikroskopie

4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)
Microvilli

Die Abb. 8 zeigt ein Präparat des intermediären Präparationsschritts S4. Man erkennt ein Bürstensaummembranfragment mit einem zusammenhängenden Microvillibesatz. Die Microvilli sind ca. 1,5 bis 4 µm lang und weisen einen Durchmesser von ca. 0,2 µm auf.

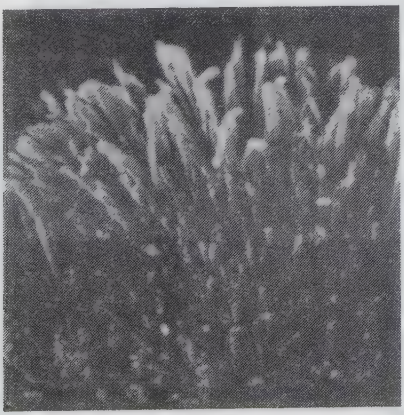


Abb. 8: Bürstensaum des Nierentubulus der Ratte
(REM, Vergrößerung 5000x)

4.2.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)
Membranvesikel

Die Abb. 9 bis 11 zeigen in steigender Vergrößerung ein Präparat der zur Inkubation verwendeten Membransuspension S7. Man erkennt kugelige und schlauchartige Membranstrukturen. Hierbei handelt es sich um die aus Microvilli rekonstruierten Membranvesikel. Die Durchmesser der Vesikel betragen zwischen 0,5 und 5 µm. Die schlauchartigen Strukturen zeigen Durchmesser von 0,5 bis 4,5 µm und größere Kaliberschwankungen. Im Bild markiert ein Pfeil die Stelle einer möglichen Vesikelabschnürung. Die kugeligen Strukturen erscheinen allseits geschlossen.

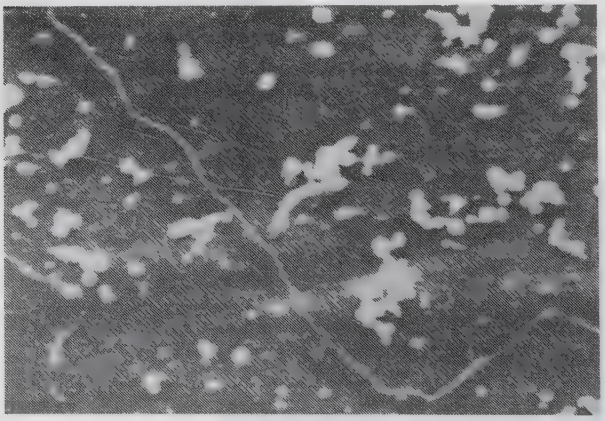


Abb. 9: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere
(REM, Vergrößerung 1000x)

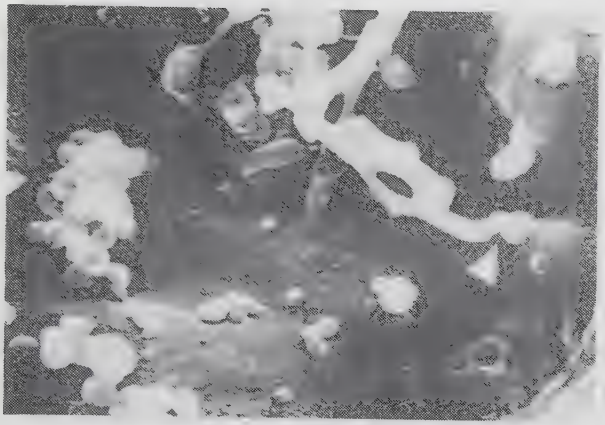


Abb. 10: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere
(REM, Vergrößerung 2000x)

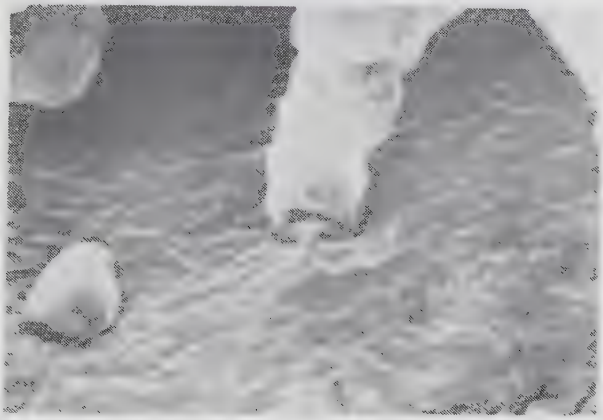


Abb. 11: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere
(REM, Vergrößerung 10000x)

4.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TM)

Die Abb. 12 bis 14 zeigen in zunehmender Vergrößerung Präparate der zur Inkubation verwendeten Membransuspension S7. Man erkennt schlauchartige Membranstrukturen in Längs- und Querschnitten (Querdurchmesser ca. 0,1 bis 0,2 µm, Länge ca. 1 µm), die abgescherten Microvilli entsprechen. Daneben sieht man größere ringförmige Strukturen mit Durchmessern zwischen 0,3 und 1,5 µm, die zum Teil auch fingerförmige Ausstülpungen aufweisen (Pfeil). Hierbei handelt es sich um Anschnitte von Membranvesikeln, die sich aus den Bürstensaumfragmenten gebildet haben. Vereinzelt sieht man auch runde Strukturen mit sehr elektronendichtem Inhalt, die Lysosomen entsprechen dürften. Die Membranoberfläche von Microvilli und Vesikeln erscheint etwas unscharf begrenzt, wie in Abb. 12 gut zu erkennen ist. Dies ist als 'fuzzy coat' bzw. Glycocalix der Nierenmicrovilli beschrieben worden (SACKTOR (96)).

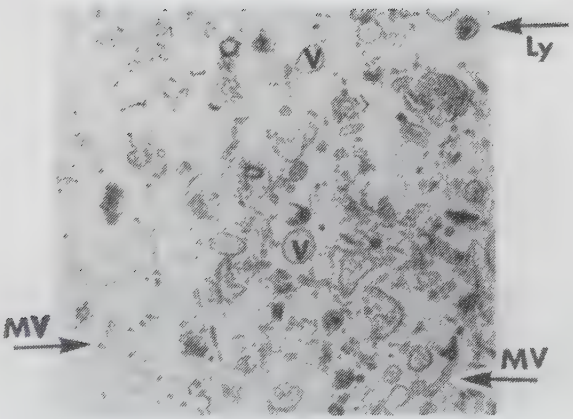


Abb. 12: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere
(TM, Vergrößerung 10000x)
V = Vesikel
MV = Microvillusanschnitt
Ly = Lysosomen

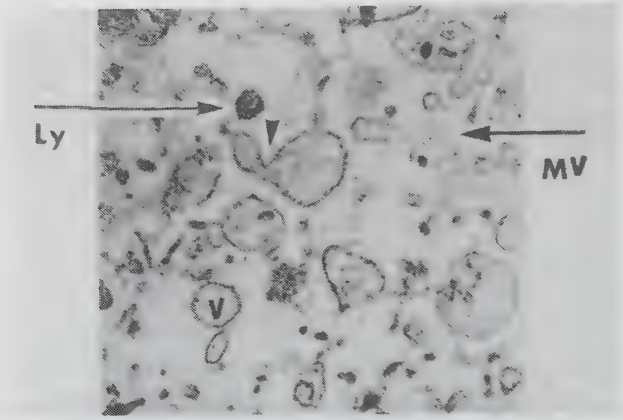


Abb. 13: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere
(TM, Vergrößerung 20000x)
V = Vesikel
MV = Microvillusanschnitt
Ly = Lysosom

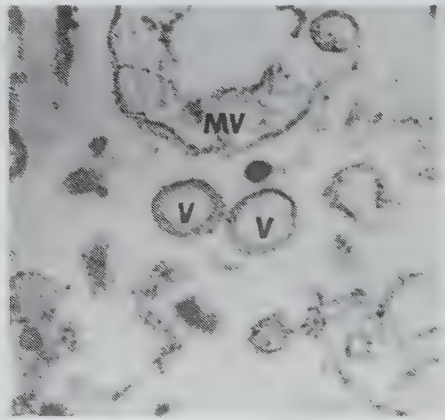


Abb. 14: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere
(TM, Vergrößerung 40000x)
V = Vesikel
MV = Microvillusanschnitt

4.2.3.1 Triton-X-100-behandelte Membranen

Die Abb. 15 bis 17 zeigen in steigender Vergrößerung Präparate der zur Inkubation verwendeten Membransuspension S7, die mit dem Detergens Triton-X-100 versetzt wurde. Die in den vorigen Bildern beschriebenen schlauch- und ringförmigen geschlossenen Strukturen sind nur ganz vereinzelt aufzufinden. Es überwiegen die amorphen Membranfragmente.

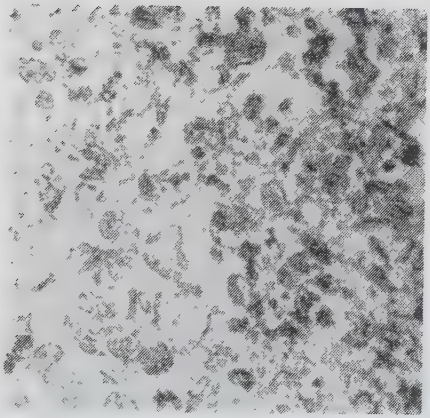


Abb. 15: Triton-X-100-behandelte Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere
(TM, Vergrößerung 10000x)

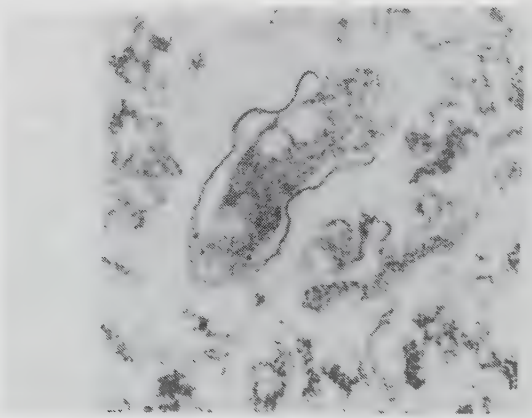


Abb. 16: Triton-X-behandelte Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere
(TM, Vergrößerung 20000x)

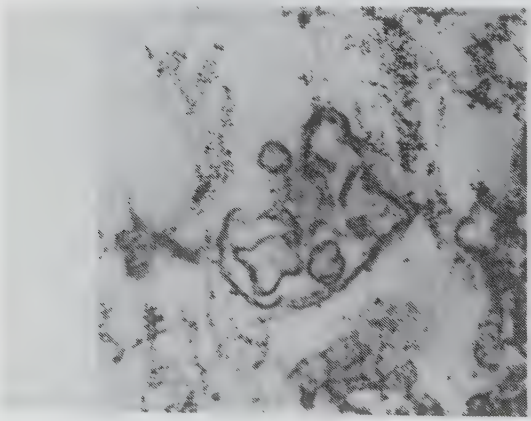


Abb. 17: Triton-X-behandelte Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere
(TM, Vergrößerung 40000x)

4.3 Enzymaktivitäten der Präparation

Die Angaben über spezifische Aktivitäten und Gesamtaktivitäten der untersuchten Enzyme sind in den Tabellen 4-11 zusammengefaßt. Die statistische Prüfung wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt (IMMICH (45)). Die Signifikanz wurde nur bei den Werten der spezifischen Aktivität geprüft, da sich die Gesamtaktivität aus dem Produkt spezifische Aktivität und Proteinmenge zusammensetzt und keine vollkommen unabhängige Größe darstellt.

4.3.1 Alkalische Phosphatase, EC 3.1.3.1

Die Alkalische Phosphatase konnte in vergleichbaren Aktivitäten in den Nierenhomogenaten von "Aldo"- und "Kontroll"-Tieren nachgewiesen werden. Bei der Vesikelpräparation wurde das Enzym in beiden Gruppen rund zehnfach angereichert. Von der Gesamtaktivität an Alkalischer Phosphatase im Homogenat waren rund 10% in der Vesikelfraktion aufzufinden.

4.3.2 Saure Phosphatase, EC 3.1.3.2

Die Bestimmung der Sauren Phosphatase ergab keine Unterschiede zwischen Aldosteron-substituierten und -deprivierten Tieren. In der Vesikelfraktion konnte eine 2- bis 3-fache Aktivitätserhöhung gegenüber dem Homogenat festgestellt werden. Von der Gesamtaktivität an Saurer Phosphatase im Homogenat waren 2-3% in der Vesikelfraktion aufzufinden.

Tab. 4 A: Alkalische Phosphatase
spezif. Aktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	RSA Aldo	RSA Kontrolle
Homogenat	1,48±0,11 n.s. (11)	1,68±0,12 (11)	1	1
Vesikel	15,6±1,33 n.s. (19)	16,6±1,87 (19)	9,3 (11)	10,0 (11)

Angaben in µMol/min x mg Prot.±S.E.M.; RSA = relative spezifische Aktivität; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 4 B: Alkalische Phosphatase
Gesamtaktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	Ausbeute % ('recovery') Aldo	Ausbeute % ('recovery') Kontrolle
Homogenat	1425±175 (11)	1667±394 (11)	100	100
Vesikel	148±58 (14)	160±71 (14)	10,1 (11)	9,5 (11)

Angaben in µMol/min±S.D.; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 5 A: Saure Phosphatase
spezif. Aktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	RSA Aldo	RSA Kontrolle
Homogenat	44,4±8,7 n.s. (9)	51,7±14,0 (9)	1	1
Vesikel	95,1±6,6 n.s. (10)	76,6±10,0 (10)	3,3	2,4

Angaben in nMol/min x mg Prot.±S.E.M.; RSA=relative spezifische Aktivität; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 5 B: Saure Phosphatase
Gesamtaktivität

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	Ausbeute % ('recovery') Aldo	Ausbeute % ('recovery') Kontrolle
Homogenat	44500±27000 (9)	53600±46000 (9)	100	100
Vesikel	884±269 (10)	738±420 (10)	2,9 (9)	2,2 (9)

Angaben in nMol/min±S.D.; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 6 A: Lactat-Dehydrogenase
spezif. Aktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	RSA Aldo	RSA Kontrolle
Homogenat	793±49 * (10)	912±54 (10)	1	1
Vesikel	12,3±3,0 n.s. (14)	13,3±3,1 (13)	0,021 (9)	0,017 (9)

Angaben in nMol/min x mg Prot.±S.E.M.; RSA=relative spezifische Aktivität; n=Anzahl der Bestimmungen.

* p 0,05 bei zweiseitiger Testung

Tab. 6 B: Lactat-Dehydrogenase
Gesamtaktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	Ausbeute % ('recovery') Aldo	Ausbeute % ('recovery') Kontrolle
Homogenat	777000±132000 (10)	887000±220000 (10)	100	100
Vesikel	123±77 (11)	126±77 (11)	0,016 (10)	0,014 (10)

Angaben in nMol min±S.D.; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 7 A: Glucose-6-Phosphatase
spezif. Aktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	RSA Aldo	RSA Kontrolle
Homogenat	70,0±4,7 n.s. (7)	98,3±21,0 (6)	1	1
Vesikel	77,0±13,0 n.s. (7)	74,4±16,0 (8)	1,2 (5)	1,0 (6)

Angabe in nMol/min x mg Prot.±S.E.M.; RSA=relative spezifische Aktivität; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 7 B: Glucose-6-Phosphatase
Gesamtaktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	Ausbeute % ('recovery') Aldo	Ausbeute % ('recovery') Kontrolle
Homogenat	76900±11900 (6)	107000±46000 (6)	100	100
Vesikel	688±400 (7)	726±585 (8)	0,94 (5)	0,74 (5)

Angaben in nMol/min±S.D.; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 8 A: Citrat-Synthase
spezif. Aktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	RSA Aldo	RSA Kontrolle
Homogenat	149±17 n.s. (12)	145±15 (12)	1	1
Vesikel	2,24±0,60 n.s. (11)	2,65±0,53 (12)	0,015 (10)	0,017 (11)

Angaben in nMol/min x mg Prot.±S.E.M.; RSA=relative spezifische Aktivität; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 8 B: Citrat-Synthase
Gesamtaktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	Ausbeute % ('recovery') Aldo	Ausbeute % ('recovery') Kontrolle
Homogenat	151000±63000 (12)	142000±50000 (12)	100	100
Vesikel	25,2±21,6 (11)	29,0±19,5 (12)	0,019 (10)	0,019 (10)

Angaben in nMol/min±S.D.; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 9 A: Gesamt-ATPase
spezif. Aktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	RSA Aldo	RSA Kontrolle
Homogenat	155±16 n.s. (12)	222±51 (12)	1	1
Vesikel	250±35 n.s. (12)	229±28 (13)	1,7 (11)	1,3 (12)

Angaben in nMol/min x mg Prot.±S.E.M.; RSA=relative spezifische Aktivitäten; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 9 B: Gesamt-ATPase
Gesamtaktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	Ausbeute % ('recovery') Aldo	Ausbeute % ('recovery') Kontrolle
Homogenat	147000±31000 (12)	220000±184000 (12)	100	100
Vesikel	2640±1530 (12)	2600±1590 (13)	1,7 (11)	1,7 (12)

Angaben in nMol/min±S.D.; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 10 A: Mg^{2+}-ATPase
spezif. Aktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	RSA Aldo	RSA Kontrolle
Homogenat	99±9 n.s. (12)	159±36 (12)	1	1
Vesikel	164±24 n.s. (12)	176±17 (12)	1,8 (11)	1,7 (12)

Angaben in nMol/min x mg Prot.± S.E.M.; RSA=relative spezifische Aktivität; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 10 B: Mg^{2+}-ATPase
Gesamtaktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	Ausbeute % ('recovery') Aldo	Ausbeute % ('recovery') Kontrolle
Homogenat	96300±25100 (12)	153000±127000 (12)	100	100
Vesikel	1770±1060 (12)	1970±1020 (13)	1,8 (11)	1,6 (12)

Angaben in nMol/min±S.D.; n=Anzahl der Bestimmungen.

Tab. 11 A: Na^+-K^+-ATPase
spezif. Aktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	RSA Aldo	RSA Kontrolle
Homogenat	55±12 n.s. (12)	63±18 (12)	1	1
Vesikel	86±16 ** (12)	53±12 (13)	2,0 (11)	0,9 (12)

Angaben in nMol/min x mg Prot.±S.E.M.; n=Anzahl der Bestimmungen; RSA=relative spezifische Aktivität.

** p 0,01 bei zweiseitiger Testung

Tab. 11 B: Na^+-K^+-ATPase
Gesamtaktivitäten

Membranfraktion	Aldo (n)	Kontrolle (n)	Ausbeute % ('recovery') Aldo	Ausbeute % ('recovery') Kontrolle
Homogenat	48500±28700 (12)	67100±68400 (12)	100	100
Vesikel	873±603 (12)	588±551 (13)	2,2 (11)	1,0 (12)

Angaben in nMol/min±S.D.; n=Anzahl der Bestimmungen.

4.3.3 Lactat-Dehydrogenase, EC 1.1.1.27

Eine signifikante Aktivitätsminderung von etwa 13% konnte im Nierenhomogenat der Aldosteron-behandelten Tiere bei der Lactat-Dehydrogenase festgestellt werden. Die LDH-Aktivität der Vesikelfraktion lag in 8 der 14 bzw. 13 Bestimmungen unterhalb der Nachweisgrenze. Von der Gesamtaktivität an Lactat-Dehydrogenase im Homogenat waren weniger als 0,016% in der Vesikelfraktion nachweisbar. Die Vesikelfraktionen wiesen keinen hormonbedingten Unterschied auf.

4.3.4 Glucose-6-Phosphatase, EC 3.1.3.9

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase wurde durch Aldosteronsubstitution weder im Nierenhomogenat noch in der Vesikelfraktion verändert. Die spezifische Aktivität des Enzyms blieb im Verlauf der Membranpräparation gleich. Von der Gesamtaktivität an Glucose-6-Phosphatase im Homogenat waren 0,7-0,9% in der Vesikelfraktion nachweisbar.

4.3.5 Citrat-Synthase, EC 4.1.3.7

Die spezifische Aktivität der Citrat-Synthase wurde durch die Vesikelpräparation auf 1,5-1,7% des Ausgangswertes reduziert. Aldosteron-bedingte Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Von der Gesamtaktivität an Citrat-Synthase im Homogenat waren in der Vesikelfraktion 0,019% nachweisbar.

4.3.6 Gesamt-ATPase, Mg^{2+}-ATPase, EC 3.6.1.3 und Na^+-K^+-ATPase, EC 3.6.1.4

Die Gesamt-ATPase-Aktivität der Membranfraktionen wies keine Aldosteron-bedingten Unterschiede auf. Die Vesikelpräparation führte zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität der Gesamt-ATPase auf das 1,7- bzw. 1,3-fache der Werte im Homogenat.

Eine Aufschlüsselung der Enzymarten ergab eine Anreicherung der Mg^{2+}-ATPase in der Vesikelfraktion von Aldosteron- und Kontrollgruppe auf das 1,8- bzw. 1,7-fache der Homogenat-Werte.

Die Bestimmung der Na^+-K^+-ATPase in der Vesikelfraktion ergab eine signifikant höhere Aktivität des Enzyms in der Aldosteron-behandelten Gruppe. In der Hormongruppe war die spezifische Aktivität gegenüber dem Homogenat-Wert verdoppelt, in der Kontrollgruppe auf 90% des Ausgangswertes abgesunken. Der Anteil der Na^+-K^+-ATPase an der Gesamt-ATPase-Aktivität betrug bei den Aldosteron-behandelten Nieren 35% im Homogenat und 34% in der Vesikelfraktion. In der Kontrollgruppe lag dieser Anteil bei 28% im Homogenat und 23% in der Vesikelfraktion. Von der Gesamtaktivität an Na^+-K^+-ATPase im Homogenat waren in der Vesikelfraktion der Aldosteron-Gruppe 2,2% und in der Kontrollgruppe 1% nachweisbar.

4.3.7 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung ergab keine hormonbedingten Unterschiede. Das Ausgangsmaterial bestand aus 9,93 $\pm$ 2,4 g Nierengewebe bei den Aldosteron-behandelten Tieren und 9,68 $\pm$ 2,4 g bei den Kontroll-Tieren. Das Nierenhomogenat enthielt 1013 $\pm$ 232 mg Protein in der Hormongruppe und

987 ± 183 mg in der Kontrollgruppe. Die Ausbeute an Vesikelprotein betrug in der Aldosteron-behandelten Gruppe 10,4 ± 3,1 mg und 10,5 ± 3,6 mg in der Kontrollgruppe (Angaben ± S.D., n=13).

4.4 Intravesikuläre Na-Aufnahme

4.4.1 Kinetik der Na^+-Aufnahme in Membranvesikel

Die Abb. 18 zeigt die Na^+-Aufnahme der Vesikelpräparation aus aldosteronsubstituierten Nieren im Zeitraum zwischen 2 Sekunden und 6 Minuten unter optimalen pH-Bedingungen. Sie stellt eine Summenkurve aus verschiedenen Inkubationsreihen dar.

Bei der ersten Inkubationsserie mit Meßzeitpunkten zwischen 15 Sekunden und 6 Minuten (siehe Abschnitt 2.5.1) ist bereits ein Gleichgewichtszustand des Na^+-Gehaltes der Vesikel eingetreten, bei ca. 900 nVal Na^+/mg Prot. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Hormon- und Kontrollgruppe.

Die daraufhin mit einer neuen Methode durchgeführten Untersuchungen im Zeitraum zwischen 2 und 10 Sekunden ergaben eine Aufnahmekinetik mit maximalen Na^+-Aufnahmewerten bis 1400 nVal Na^+/mg Prot. Das Aufnahmemaximum der Hormongruppe wurde später (Max. bei 8 Sekunden) erreicht und lag geringfügig höher als bei der Kontrollgruppe (Max. bei 4 Sekunden).

Bei zweiseitiger Testung ergab sich für den Zeitpunkt 8 Sekunden im Wilcoxon-Test ein signifikanter Unterschied auf dem 5%-Niveau. Aus der graphischen Auswertung der Fläche unter der Aufnahmekurve, die die Na^+-Gesamtaufnahme dar-

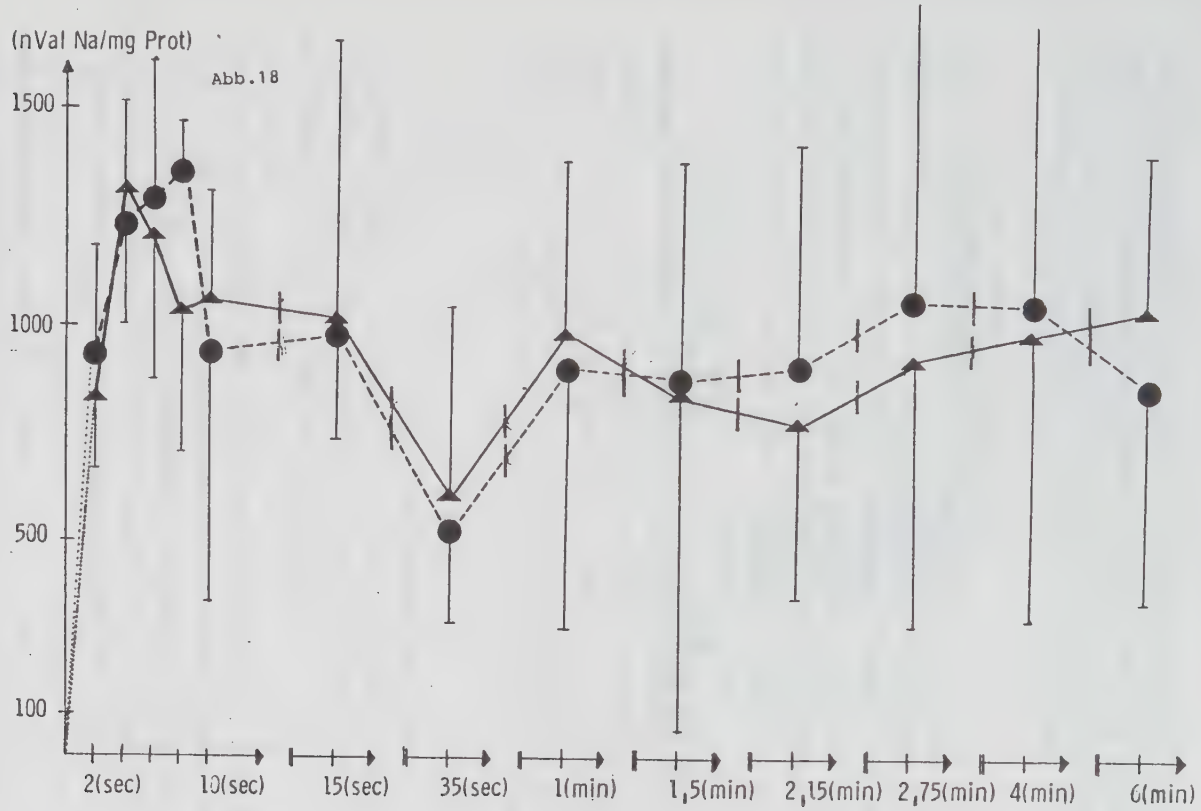
stellt, ergibt sich für den Zeitraum 2-10 sec. eine um 8% höhere Na^+-Aufnahme der Aldosteron-Vesikel im Vergleich mit den Kontrollen.

Entsprechende Na^+-Aufnahmecharakteristiken im Sekundenbereich erhielten wir auch bei Versuchen mit Membranvesikeln nicht adrenalektomierter, unbehandelter Ratten. Im gemessenen Zeitraum stieg die Na-Aufnahme bis zu einem Höchstwert von ca. 1700 nVal Na/mg Prot. zum Zeitpunkt 10 Sekunden (s.Abb. 19).

Abb. 18: Intravesikale Na-Aufnahme in Membranvesikel der Aldosterongruppe ●– – – – – – – – – – – – ● und der Kontrollgruppe ▲——————————▲

Aufnahmezeitraum:			
	2 - 8	Sekunden	n=4
	10	Skunden	n=8
	15	Sekunden	n=9
	35	Sekunden	n=4
	1	Minute	n=9
	1,5	Minuten	n=12
	2,15	Minuten	n=3
	2,75	Minuten	n=10
	4	Minuten	n=11
	6	Minuten	n=8

Aufnahmebedingungen: pH 7,4 - pH 7,5 - pH 7,5
S.E.M. einseitig aufgetragen


(nVal Na/mg Prot)
Abb.18
1500
1000
500
100
2(sec)
10(sec)
15(sec)
35(sec)
1(min)
1,5(min)
2,15(min)
2,75(min)
4(min)
6(min)

4.4.2 Einfluß von pH-Veränderungen

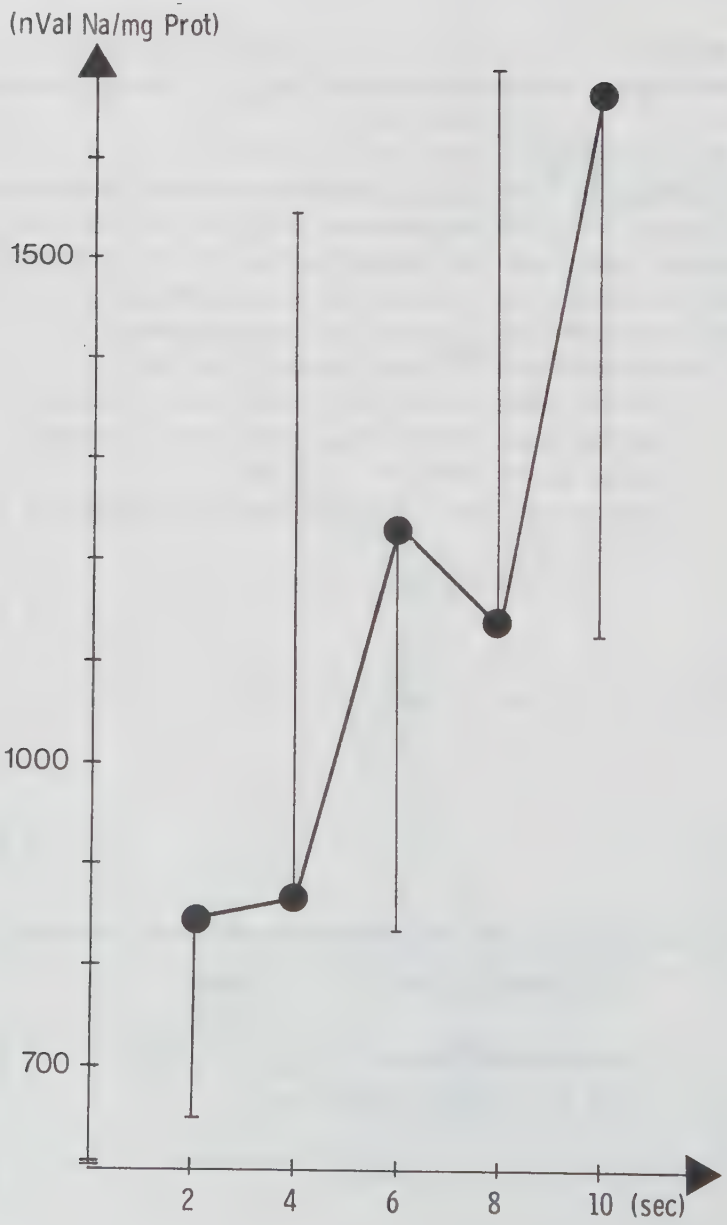
Weiterhin untersuchten wir die pH-Abhängigkeit der intravesikulären Na^+-Aufnahme im Zeitraum von 2 bis 12 Sekunden.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Na^+-Aufnahme zwischen Membranen adrenalektomierter aldosteronbehandelter und NaCl-behandelter Kontrolltiere nachgewiesen werden. Deutliche Unterschiede wurden in der absoluten Höhe der Na^+-Aufnahme der Membranvesikel festgestellt. Sie waren vom pH-Wert der drei Inkubationslösungen abhängig, denen wir sie im Versuchsverlauf aussetzten (s. Abb. 20):

1. Puffer Gamma, in dem die Präparation erfolgte,
2. Na^+-haltiger Puffer Beta, der zur Na^+-Aufnahme zugesetzt wurde, und
3. Spülpuffer Alpha, der die Inkubation beendete.

Abb. 19: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel nicht adrenalektomierter, unbehandelter Ratten
Aufnahmezeitraum: 2 - 10 Sekunden
2 - 8 Sekunden n=2
10 Sekunden n=3
Aufnahmebedingungen: pH_α 7,4 - pH_β 7,5
pH_γ 7,5
S.E.M. einseitig aufgetragen

Abb.19

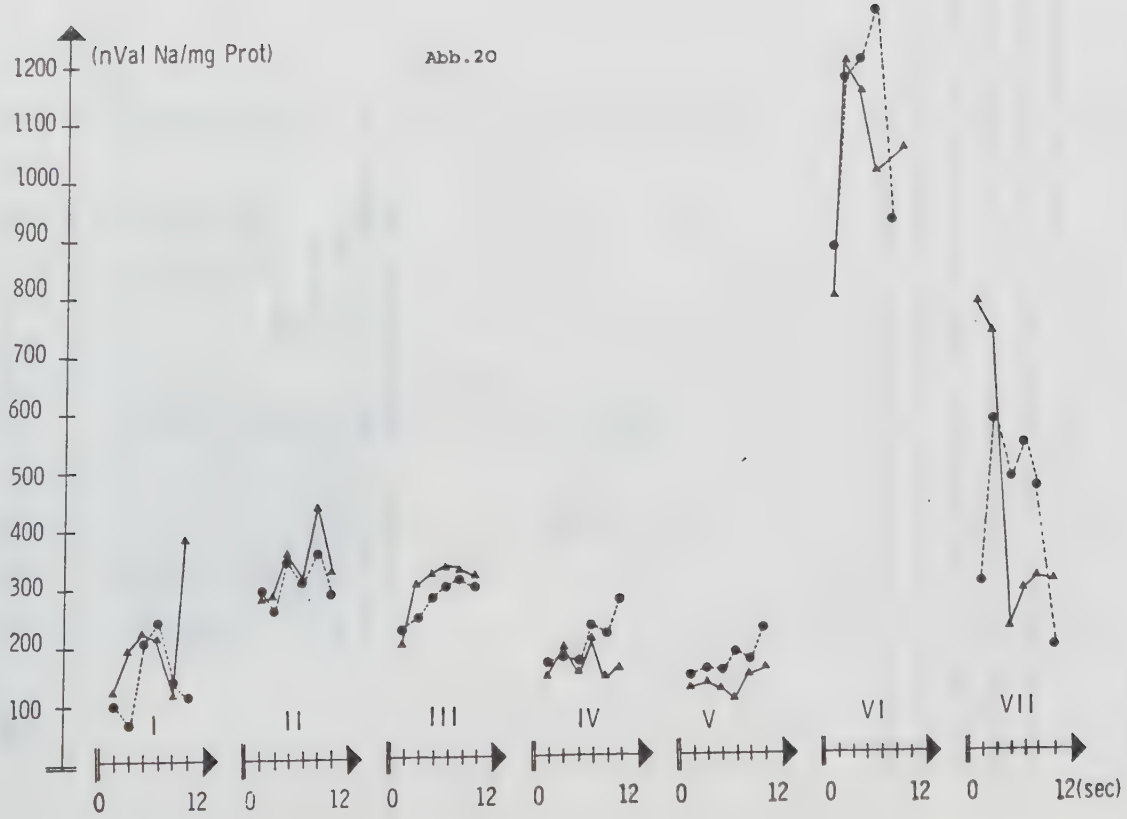


Vergleichbare Ergebnisse konnten bei Membranvesikeln nicht adrenalektomierter, unbehandelter Ratten erzielt werden. (Abb. 21).

In Abb. 22 ist die mittlere Na^+-Aufnahme der Membranvesikel im Zeitraum 2 bis 12 Sekunden, in Abhängigkeit von den pH-Stufen des Präparationspuffers Gamma, des Inkubationspuffers Beta und des Spülpuffers Alpha dargestellt. Die Werte wurden als arithmetisches Mittel pro Inkubationsintervall (2 Sekunden) und nach steigendem pH-Wert angeordnet.

Abb. 20: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel der Aldosterongruppe ●– – – – – – –● und der Kontrollgruppe ▲——————▲
Aufnahmezeitraum: 2-12 Sekunden
Aufnahmebedingungen:

I)	pH α 7,4 - pH β 4,5 - pH γ 4,0	n=1
II)	pH α 7,4 - pH β 4,5 - pH γ 4,5	n=7
III)	pH α 7,4 - pH β 6,0 - pH γ 6,0	n=9
IV)	pH α 7,4 - pH β 6,0 - pH γ 7,5	n=4
V)	pH α 7,4 - pH β 6,0 - pH γ 8,2	n=7
VI)	pH α 7,4 - pH β 7,5 - pH γ 7,5	n=4
VII)	pH α 7,4 - pH β 8,2 - pH γ 8,2	n=6


(nVal Na/mg Prot)
Abb.20
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
I
II
III
IV
V
VI
VII
0
12
0
12
0
12
0
12
0
12
0
12
0
12(sec)

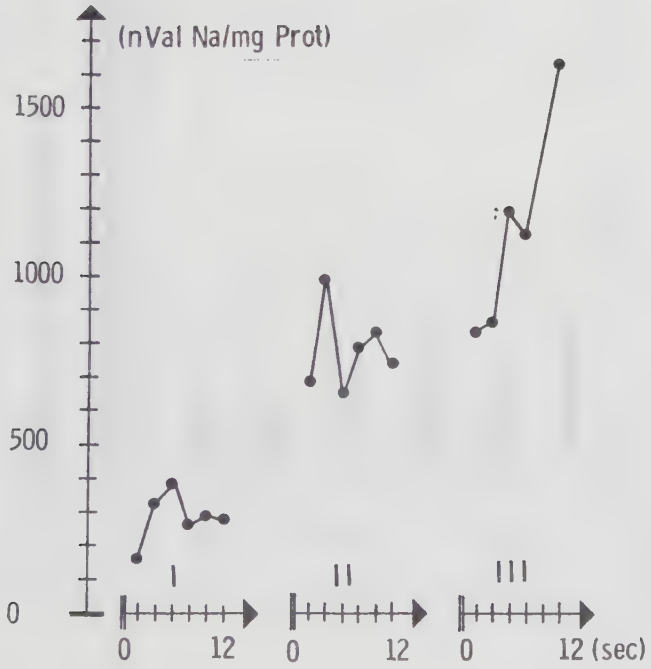


Abb. 21: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel normaler unbehandelter Ratten
Aufnahmezeitraum: 2-12 Sekunden
Aufnahmebedingungen:
I) pH α 5,5 - pH β 7,5 - pH γ 7,5 n=6
II) pH α 5,5 - pH β 7,5 - pH γ 8,2 n=6
III) pH α 7,4 - pH β 7,5 - pH γ 7,5 n=2

Abb.22

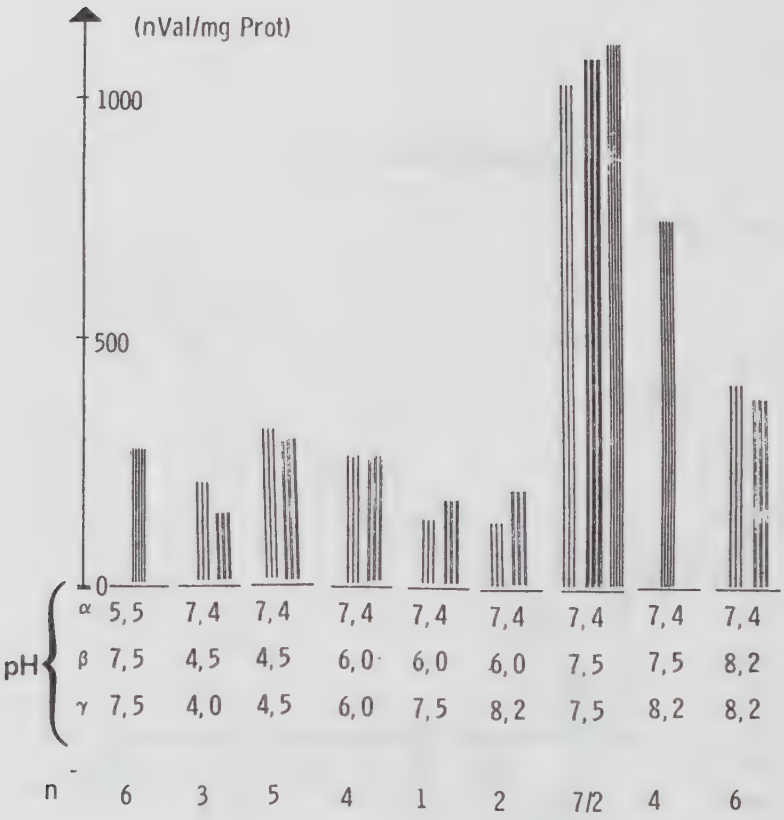


Abb. 22: Mittlere intravesikale Na^+-Aufnahmewerte bei verschiedenen pH-Stufen
Aufnahmebedingungen: 2-12 Sekunden, davon das arithmetische Mittel
n=Versuchsanzahl

normale, unbehandelte Ratten
adrenalektomierte, aldosteronbehandelte Ratten
adrenalektomierte Kontrolltiere

4.4.3 Temperatureinfluß

In einer Versuchsreihe wurde die Na^+-Aufnahme bei 25°C und bei 0°C unter sonst gleichen Bedingungen gemessen.

Die Werte lagen bei 0°C insgesamt niedriger als bei 25°C, auch fehlte die maximale Aufnahme bei 6 Sekunden (s.Abb. 23).

4.4.4 Einfluß von Triton-X-100

Zur Prüfung der Vesikel auf Dichtigkeit versetzten wir einen Teil der Membranen mit dem Mebransolubilisator Triton-X-100 (s. Abschnitt 3.3).

Bei Triton-X-100-behandelten Membranvesikeln ließen sich deutlich niedrigere Na^+-Konzentrationen nachweisen als bei nicht mit Triton-X-100-behandelten Vesikeln unter sonst gleichen Bedingungen (s. Abb. 24-27).

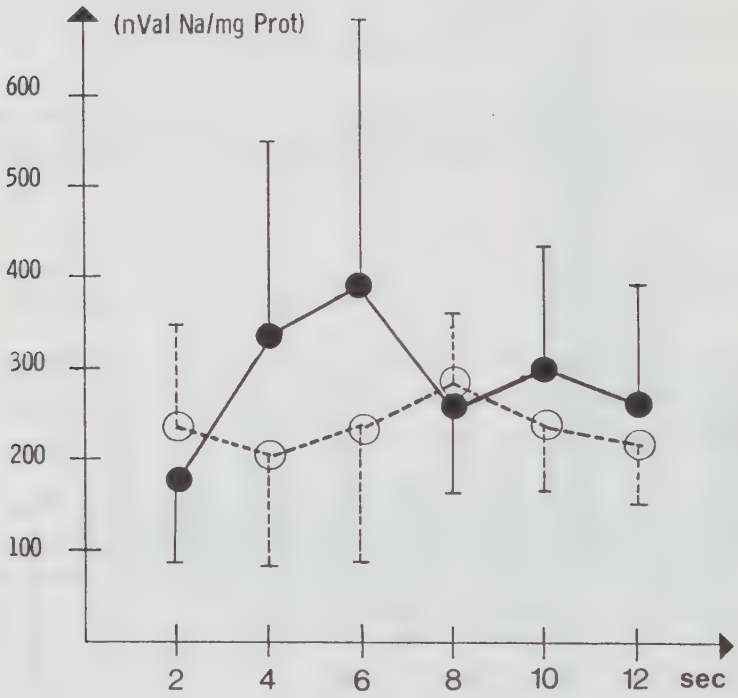


Abb. 23: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel normaler unbehandelter Ratten
Aufnahmezeitraum: 2-12 Sekunden
Aufnahmebedingungen:
Normalgruppe 25°C
Normalgruppe 0°C
n=6
pH α 5,5 - pH β 7,5 - pH γ 7,5
S.E.M. einseitig aufgetragen

Abb.24

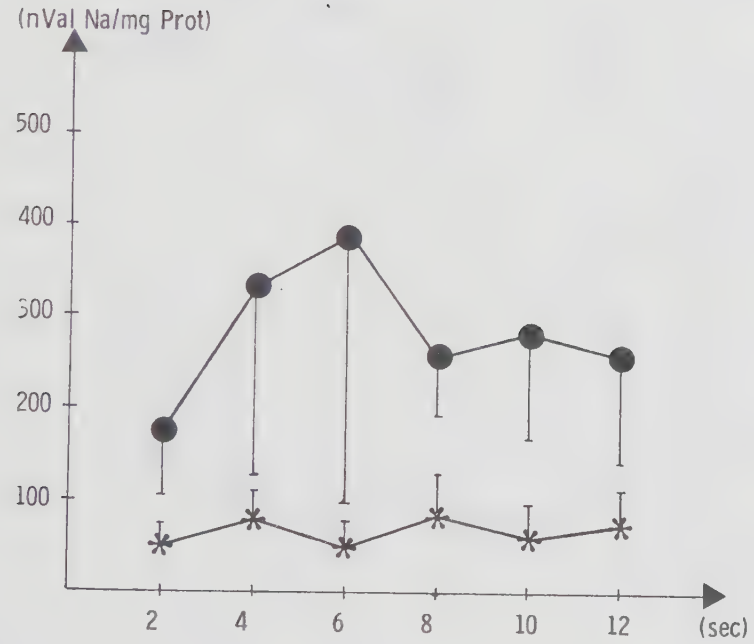


Abb. 24: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel von normalen Rattennieren ●——● im Vergleich zur Na^+-Aufnahme Triton-X-behandelter Membranvesikel *——*
Aufnahmezeitraum: 2-12 Sekunden
n=6
Aufnahmebedingungen: pH α 5,5 - pH β 7,5 - pH γ 7,5
S.E.M. einseitig aufgetragen

Abb.25

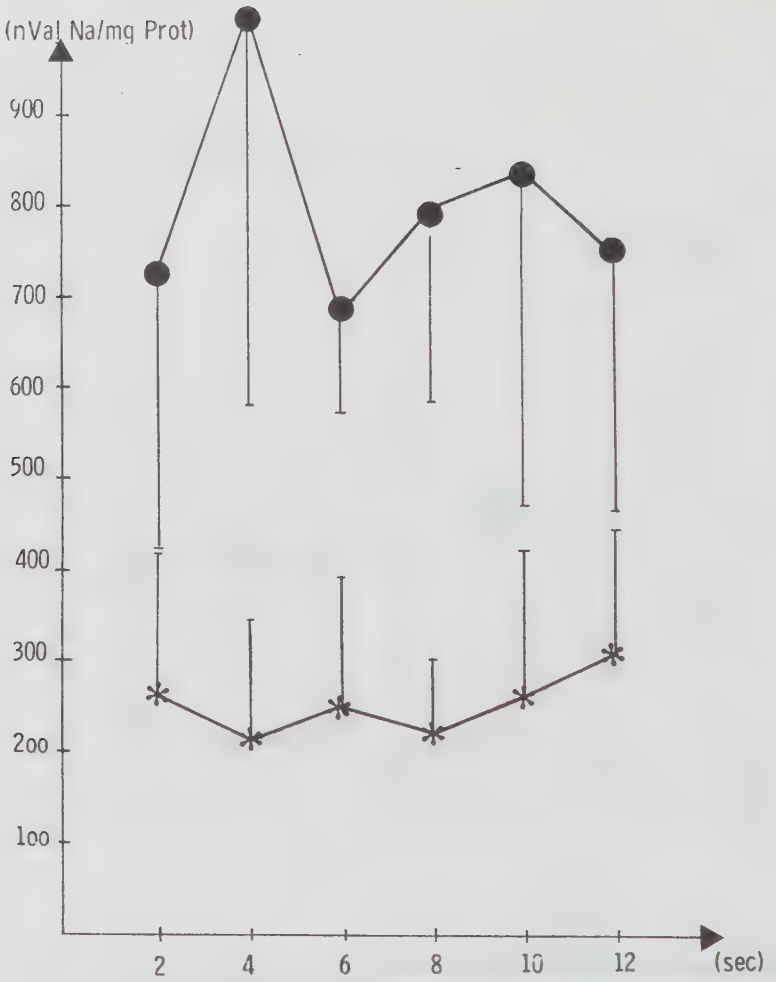
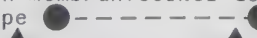
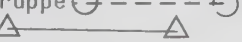


Abb. 25: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel von normalen Rattennieren ●——● im Vergleich zur Na^+-Aufnahme Triton-X-behandelter Membranvesikel ✻——✻
Aufnahmezeitraum: 2-12 Sekunden
n=4
Aufnahmebedingungen: pH α 7,4 - pH β 7,5 - pH γ 8,2
S.E.M. einseitig aufgetragen

Abb. 26: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel der Aldosterongruppe  und der Kontrollgruppe im Vergleich zur Na^+-Aufnahme in Triton-X-behandelte Membranvesikel der Aldosterongruppe  und der Kontrollgruppe

Aufnahmezeitraum: 2-10 Sekunden
n=4 für unbehandelte Membranen
n=1 für Triton-X-behandelten Membranen
Aufnahmebedingungen: pH α 7,4 - pH β 7,5 - pH γ 7,5

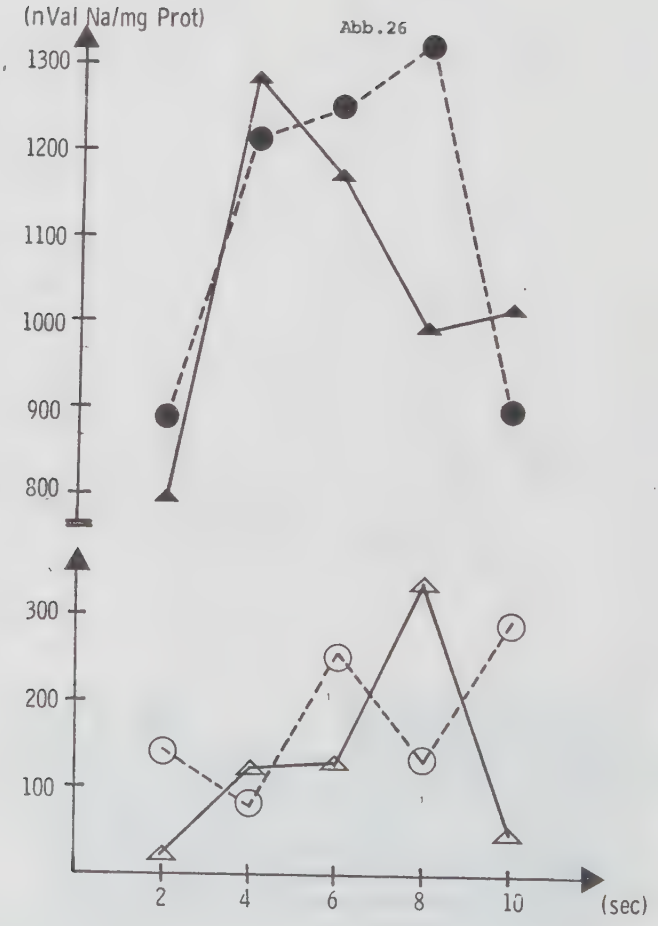

(nVal Na/mg Prot)
Abb.26
1300
1200
1100
1000
900
800
300
200
100
2
4
6
8
10
(sec)

Abb.27

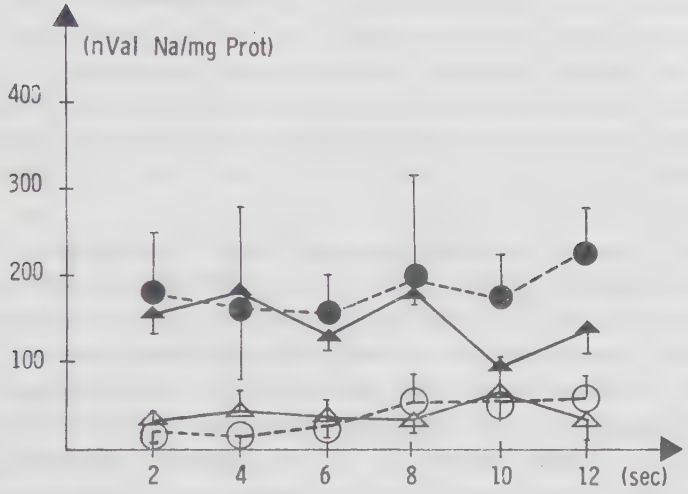


Abb. 27: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel der Aldosterongruppe ●- - - - - - - - ● und der Kontrollgruppe ▲———— ▲ im Vergleich zur Na^+-Aufnahme in Triton-X-behandelte Membranvesikel der Aldosterongruppe ○- - - - - ○ und der Kontrollgruppe △———— △

Aufnahmezeitraum: 2-12 Sekunden
n=4
Aufnahmebedingungen: pH α 7,4 - pH β 6,0 - pH γ 7,5
S.E.M. einseitig aufgetragen

5. DISKUSSION

5.1 Wirksamkeit von Aldosteron am Organismus

Die Wirksamkeit der Adrenalektomie und der Aldosteronsubstitution am Gesamtorganismus der Versuchstiere wird am deutlichsten bei der Netto-Natrium- und -Kalium-Ausscheidung (4.1). In der Literatur wird der Na^+/K^+-Quotient im Blasenurin als verläßlichstes Maß für die Wirksamkeit der Aldosterondeprivation bzw. der Aldosteronsubstitution verwendet (LUDENS (75)).

Der erhöhte Na^+-/K^+-Quotient nach Hormonsubstitution (Tab.3, Abb.7) ist auf eine trotz NaCl-Tränkung eingetretene Natriumverarmung des Gesamtorganismus der adrenalektomierten Ratten zurückzuführen. Diese Tiere reagieren auf die Gabe eines Mineralocorticoides um so stärker, je geringer die vorausgegangene tägliche NaCl-Zufuhr war (DEETJEN (18)). Die entgegengesetzte Reaktion, die abnehmende Wirkung langdauernder, hoher Mineralocorticoidgabe auf die Natriumretention ist als Escape-Phänomen bekannt. Beim Erreichen eines bestimmten Volumens des Extrazellulärraumes wird die Rückkehr der Natriumausscheidung zu normalen Verhältnissen bei etwa spiegelbildlichem Verhalten des Kaliums beobachtet.

5.2 Membrancharakterisierung durch Elektronenmikroskopie

Die transmissionselektronenoptischen Bilder des Untersuchungsmaterials (Abb.12-14) stimmen mit den in der Literatur veröffentlichten Abbildungen überein. (BOOTH (12); HEIDRICH (38); JUNQUEIRA (47); SACKTOR (95); SACKTOR (96); WARD (124); WILFONG (127)). Die in Abb. 13 und 14 sehr gut zu sehende Glycocalix wurde schon von SACKTOR (96) und MURER (84) beschrieben. Sie ermöglicht elektronenoptisch die Un-

terscheidung von Vesikeln aus basal-lateralen Membranen, die ein "fuzzy coat" nicht aufweisen, sondern völlig glatt sind.

Die Größenverhältnisse stimmen ebenfalls mit den oben zitierten Autoren überein. EVERS (26) vermutet, daß bei der Ca^{++}-Präcipitationsmethode und Differentialzentrifugation die gewonnenen Vesikel ein zwei- bis dreifach kleineres Volumen aufweisen als solche, mit denen die Dichtegradienten gewonnen werden. Dies ist aber elektronenoptisch nicht beweisbar, da stets eine erhebliche Inhomogenität in der Vesikelgröße besteht (siehe auch Abb.12).

Die Hauptverunreinigung der Präparation wird durch Lysosomen verursacht (EVERS (26); BOOTH (12)).

In Abb.8 sind Bürstensaummembranen zu sehen, das Ausgangsmaterial für die Vesikelpräparation. Die Vesikelbildung aus diesen Microvilli ist rasterelektronenoptisch ebenfalls gut zu demonstrieren (Abb.9-11): Hier stellen sich die Vesikel als geschlossene Strukturen dar.

5.3 Membranvesikellyse durch Triton-X-100

Nach Lyse der geschlossenen Membrankügelchen mittels Triton-X-100 (3.3.) zeigt sich elektronenoptisch ein völlig anderes Bild (Abb.15-17) als bei vergleichbaren Darstellungen nicht-lysierter Membranvesikel (Abb.12-14). Auch die Natrium-Aufnahmeversuche von Triton-lysierten Vesikeln im Vergleich zu nicht-lysierten (Abb.24-27) bestätigen, daß dichte Membranvesikel durch Triton-X-100 lysiert und undicht werden (WALTER (123)). Der signifikante Abfall des meßbaren Natrium (4.4.4) kann bei allen mit Triton-X-100 behandelten Vesikeln beobachtet werden. Es spielt keine Rolle, ob die Membranen nicht adrenalektomierter normaler Ratten, hormon-

deprivierter oder hormonsubstituierter Ratten untersucht werden (Abb. 24,25,26,27). Diese Versuche zeigen, daß die an intakten Vesikeln gemessenen Na^+-Werte nicht einer unspezifischen Membranadsorption entsprechen, sondern die Substrataufnahme in den Intravesicularraum repräsentieren.

5.4 Membranuntersuchung durch enzymatische Analyse

Um eine Membranpräparation enzymatisch zu untersuchen, müssen die Aktivitäten der Enzyme bestimmt werden, die hauptsächlich in der präparierten Membran lokalisiert sind. Schwierig ist der Vergleich der Enzymaktivitäten verschiedener Arbeitsgruppen, da zum Teil verschiedene Bestimmungsmethoden eingesetzt werden. SOLYOM (111) empfiehlt, die relativen Unterschiede der Markerenzyme, d.h. die Anreicherung und Verminderung der Leitenzyme zu beobachten. Die Leitenzyme für die Bürstensaummembran wurden nach den folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

a) Gute Spezifität für die wichtigen subzellulären Fraktionen,
b) Vergleichsmöglichkeit mit Ergebnissen in der Literatur,
c) gute Handhabbarkeit der Tests.

5.4.1 Bürstensaummembran

Seit den siebziger Jahren stellt die Isolierung der Bürstensaummembranen keine Schwierigkeiten dar. Dementsprechend sind auch die Markerenzyme dieser Membran bekannt. Das am häufigsten bestimmte Enzym ist die alkalische Phosphatase (WILFONG (127); QUIGLEY (91); BOOTH (12); BODE (10); WARD (124); SACKTOR (96); EVERS (26); BARAC-NIETO (5)), neben Trehalase und Lactase (SACKTOR (96); SLACK (108)). In der

vorliegenden Arbeit wurde die alkalische Phosphatase mit einem Mono-Test von Boehringer Mannheim bestimmt.

Im Nierenhomogenat werden Enzymwerte von 0,1-0,3 U/mg Protein angegeben (WILFONG (125); QUIGLEY (91); BOOTH (12); KINNE (58); WARD (124); SACKTOR (96)), die nach der Membranpräparation auf das 10- bis 17-fache (1-3 U/mg Protein) angereichert werden. Abweichend davon berichten EVERS (26) und BARAC-NIETO (5) Homogenatwerte der Alkalischen Phosphatase zwischen 0,9 und 1,7 U/mg Protein mit Anreicherungen der Microvilli-Fraktion auf das 11- bzw. 8,1-fache, entsprechend 13 bzw. 19 U/mg Protein. Bei den durchgeführten Versuchen wurden im Homogenat 1,5 U/mg Protein und in den präparierten Bürstensaummembranen eine auf das 10-fache gesteigerte Aktivität (15 U/mg Protein) der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen. Durch Adrenalektomie, bzw. Adrenalektomie und Aldosteronsubstitution konnten keine Aktivitätsveränderungen der Alkalischen Phosphatase im Vergleich zu Normaltieren festgestellt werden. Der Unterschied in der absoluten Höhe der Enzymaktivitäten zwischen den beiden eingangs genannten Autorengruppen ist offensichtlich methodischer Art. Die relativen spezifischen Aktivitäten bzw. Anreicherungen sind vergleichbar, wobei höhere Anreicherungen bei den durch Gradientenzentrifugation gewonnenen Präparationen erzielt werden (WILFONG (127)). Die Enzym-"Recovery" unserer Präparation lag mit 10% zwischen den von BOOTH (12) berichteten 8,2% und den 18%, die von EVERS (26) erzielt wurden.

Die Aktivitätszunahme der Sauren Phosphatase bei der Vesikelpräparation ist auf eine Verunreinigung durch Lysosomen zurückzuführen. Das Enzym wurde auf das 2- bis 3-fache des Ausgangswertes angereichert. SOLYOM (111) schließt eine eigenständige membrangebundene Saure Phosphatase nicht aus, betont jedoch den lysosomalen Ursprung des überwiegenden Teils dieser Enzymaktivität (ARCHAKOV (2); HARPER (37); BODE

(10); EVERS (26)). Auch das elektronenmikroskopische Bild, in dem lysosomale Strukturen erkennbar sind, kann die oben gemachte Aussage bestätigen (Abb.13). BOOTH (12) stellte ein Adsorptionsmodell bei der Zerstörung der Lysosomen zur Diskussion. In den ersten Präparationsstadien rupturieren die Lysosomen und die lysosomalen Enzyme werden an die Plasmamembranen gebunden. Es konnte gezeigt werden, daß sich durch einfache Waschung der Bürstensaumfraktion mit 0,1 M NaCl die lysosomalen Enzymaktivitäten um 50% vermindern. Das heißt, daß die Verunreinigung durch störende Lysosomen-Membranfragmente geringer ist, als die Enzymaktivität vermuten läßt. Lysosomen sind Speichervesikel für lytische Enzyme verschiedener Art. Die wesentliche Aufgabe der Lysosomenmembran besteht in der Abschottung des aggressiven Vesikelinhalts vom übrigen Zellinhalt (DeDuve, zit. n. HARPER (37)). Infolgedessen sind Elektrolyttransportvorgänge an den Lysosomen wenig wahrscheinlich und können nicht fälschlicherweise den Bürstensaumvesikeln zugeschrieben werden.

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase, einem Markerenzym der Microsomen (WARD (124); SOLYOM (111); EVERS (26); ARCHAKOV (2)) entspricht dem von WARD (124) angegebenen Wert von 50 mU/mg Protein. EVERS (26) konnte bei Anwendung der Ca^{++}-Präcipitationsmethode keine Glucose-6-Phosphatase in der Vesikelpräparation nachweisen. Bei der Membrangewinnung durch "Free-Flow-Elektrophorese" ergab sich eine 1,2-fache Anreicherung. BODE (10) berichtet über ähnliche Ergebnisse.

Bei der von WILFONG (127) durchgeführten Präparation der Bürstensaummembranen konnten keine nennenswerten Verunreinigungen durch Lysosomen und Microsomen festgestellt werden. Die Verunreinigung mit Mitochondrien war 5-10%. Zur enzymatischen Kennzeichnung des Mitochondrienanteils wurde in der vorliegenden Untersuchung die mitochondriale Citrat-Synthase bestimmt (SRERE (115); KIRSTEN (60)). Im Nierenhomogenat lag

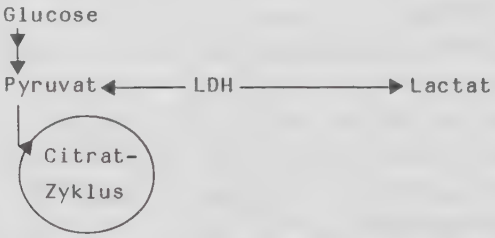
die Enzymaktivität bei 150 mU/mg Protein. Das Ergebnis steht im Einklang mit den von KIRSTEN (62; 66) nachgewiesenen Enzymaktivitäten. In der Vesikelfraktion konnten keine nennenswerten Mengen mitochondrialen Enzyms nachgewiesen werden; die Enzymgesamtaktivität fiel von 150000 mU im Homogenat auf weniger als 30 mU in der Vesikelpräparation. Solche niedrigen Kontaminationsraten werden auch von BOOTH (12) mit einer relativen spezifischen Aktivität von 0,02 für die Succinat-Dehydrogenase angegeben. BODE (10) und EVERS (26) berichten RSA-Werte von 0,1 bzw. 0,2. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten auch im elektronenmikroskopischen Bild (Abb. 12-14) keine Mitochondrien gefunden werden.

5.4.2 Lactat-Dehydrogenase

Die Lactat-Dehydrogenase ist ein typisches Enzym des Cytosols (KARLSON (49)). In der Vesikelfraktion ist die Aktivität meist unterhalb der Nachweisgrenze. Daraus läßt sich folgern, daß die löslichen Anteile des Cytoplasmas von den Bürstensaummembranen gut getrennt wurden. Es kann konstatiert werden, daß in den elektronenmikroskopischen Bildern kein cytoplasmatisches "terminal web"- oder "fibrous core"-Material (HOPFER (42)) an den Microvilli-Vesikeln zu erkennen ist.

Im Homogenat der Rattennieren ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Enzymaktivität zwischen adrenalektomierten Kontrollen und den hormonsubstituierten Tieren. KINNE (57) fand bei adrenalektomierten Ratten die höchste Aktivität (894 mU/mg Protein), bei hormonsubstituierten Tieren die niedrigste Aktivität (756 mU/mg Protein) und für normale Tiere einen dazwischen liegenden Wert (828 mU/mg Protein). Eine Deutung dieses Phänomens soll im folgenden versucht werden:

Die Lactat-Dehydrogenase ist das Enzym vor der Einmündung des Glucose-Abbaus in den Citrat-Zyklus (s. Diagramm).



Hierbei katalysiert die LDH den Übergang von Pyruvat zu Lactat und umgekehrt, entsprechend dem Redox-Zustand der Zelle. Herrschen anaerobe Verhältnisse, wird der Durchsatz durch den Citrat-Zyklus gebremst, es überwiegt die Glycolyse mit dem Endprodukt Lactat. Bei aeroben Verhältnissen wird Lactat in Pyruvat umgewandelt und der Verbrennung im Citrat-Zyklus zugeführt. Von einigen Autoren wird als Aldosteronwirkung eine vermehrte zelluläre Energiebereitstellung durch Stimulierung des Citrat-Zyklus vorgeschlagen (KIRSTEN (65); Zusammenfassung bei MARVER (77)), während bei Adrenalektomie und Aldosteronmangel ein relativ erschwerter Durchsatz durch den Krebs-Zyklus postuliert wird, der eine relativ erhöhte Glycolyse mit korrespondierender Lactatbildung bedingen könnte.

Bei Ausschüttung des Aldosterons wird mit dem gesteigerten Citrat-Zyklus auch mehr Brennstoff Pyruvat benötigt, der durch die beobachtete LDH-Aktivitätsminderung erreicht werden kann, da so die Lactat-Bildung abnimmt. Eine Untersuchung der LDH-Aktivitäten zu Zeitpunkten nach Adrenalektomie und Hormonsubstitution bei adrenalektomierten Tieren kann weiteren Aufschluß bringen.

5.4.3 Na^+-K^+-ATPase

Bei der Beurteilung der Na^+-K^+-ATPase-Aktivität müssen Einschränkungen aufgrund der Methodenvielfalt beachtet werden. Es beginnt bereits bei der Terminologie. Manche Autoren treffen keine Unterscheidung zwischen Gesamt-ATPase, Mg^{2+}-ATPase EC 3.6.1.3 und Na^+-K^+-ATPase EC 3.6.1.4 (Übersicht bei SOLYOM (111)). Für die Enzymaktivität bedeutsame Veränderungen ergeben sich durch die Probenvorbereitung. Einfrieren und Auftauen führt zu einer Erhöhung der registrierten Aktivität (BOOTH (12)). Die Inkubation von Nierenmembranvesikeln in hypoosmolaren Lösungen verdoppelte bei WALTER (123) die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität. JØRGENSEN (46) gibt eine latente Enzymaktivität von 60 - 80% an, die mit Detergentien, z.B. Deoxycholat demaskiert werden kann. WALTER (123) verwendet zum gleichen Zweck Triton-X-100. DESCH (19) fand in einer Präparation aus Sarcolemm-Membranen, daß Na-Dodecylsulfat SDS die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase erhöhte und die der Mg^{2+}-ATPase erniedrigte. Deoxycholat wirkte bezüglich der Na^+-K^+-ATPase gleichsinnig, ließ die Mg^{2+}-ATPase aber unverändert. Diese Autoren vermuten als Ursache der Detergenswirkung eine Lyse der verwendeten Membranvesikel. Es erfolgt eine Freilegung von verdeckten Reaktionsstellen, bzw. das in die Membran eingebaute Enzym wird von beiden Seiten für Substrat zugänglich. Dieser Effekt kann auch für die Aktivitätsänderung beim Einfrieren/Auftauen verantwortlich sein, ist aber wegen der Rekombinationsfähigkeit der Membranen schwer zu quantifizieren.

Bei den ATPasen gibt es wahrscheinlich verschiedene Aktivitätsstufen. QUIGLEY (91) fand zwei, durch K_m-Werte, ph-Optima und Hemmbarkeit durch Ouabain bzw. Phlorizin unterscheidbare Na^+-K^+-ATPase-Aktivitäten in Membranpräparationen aus Rattendarm. MURER (84) beschrieb eine zusammen mit Nierenbürstensaummembranmarkern aufzufindende Mg^{2+}-ATPase, die

sich in der Hemmbarkeit durch Filipin von einer mitochondrialen Mg^{2+}-ATPase unterschied.

Im Verlauf des Nephrons findet sich die größte Aktivität der Na^+-K^+-ATPase im ersten Teil des aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife (SEJERSTED (103)). Obwohl in allen Nephronabschnitten vorhanden, ist die Enzymaktivität im distalen Nephron 4 - 5 mal höher als im proximalen Tubulus (SCHMIDT (97)). Bei HEIDRICH (38) findet sich der Hinweis, die gesamte renale Zellwand besitze Mg^{2+}-ATPase in gleichbleibender Menge und Verteilung; lediglich die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase in der basal-lateralen Zellwand steigt bei Mäusen im Lauf der Embryonalzeit kontinuierlich an. Dieser Aktivitätsanstieg in der Ontogenese wurde von SCHMIDT (98) auch bei Kaninchennieren gefunden. Hier stieg die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität bei ausgewachsenen Tieren auf das Fünffache der Neugeborenenwerte, mit einer ähnlichen Verteilung entlang des Nephrons wie bei den Mäusen.

In der Literatur herrscht Einstimmigkeit, daß der weit überwiegende Teil der Na^+-K^+-ATPase in der basal-lateralen Zellwand lokalisiert ist. Doch auch in allen Microvilli-Präparationen, in denen das Enzym bestimmt wurde, fand man Na^+-K^+-ATPase-Aktivität. Es ist nicht geklärt, ob es sich dabei um eine Enzymaktivität der basal-lateralen Membran am Übergang zum Bürstensaum oder um verunreinigende freie Stükke basal-lateraler Membran in der Microvilli-Präparation handelt (HEIDRICH (38); QUIGLEY (91); SACKTOR (95)).

Die folgende Übersicht gibt die Aktivitäten der Na^+-K^+-ATPase in der Rattenniere bei verschiedenen Autoren wieder:

Autor	Präparation	spez. Aktivität (nMol/min x mg Prot.)
HEIDRICH (38)	Cortex:	
	Homogenat	57
	bas.-lat. Membran	900
	Microvilli	18
BOOTH (12)	Homogenat	162
	Microvilli	123
BODE (10)	Cortex:	
	Microvilli	18
	bas.-lat. Membran	897
SLACK (108)	Homogenat	132
	bas.-lat. Membran	330
EVERS (26)	Cortex:	
	Homogenat	324
	Microvilli	114
DOUCET (22)	Medull. aufsteig. Teil d. Henle-Schleife	600
BARAC-NIETO (5)	Bürstensäume	100
EDELMAN (24)	Cortex:	
	Homogenat	100-150
KIRSTEN (66)	Homogenate von Nierenzonen	154-516
	Homogenat	55-63
Eigene Untersuchung	Bürstensaumvesikel	53-86

Die Werte der Übersicht stammen von normalen Rattennieren. Es ist bekannt, daß durch Adrenalektomie die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase in der Niere absinkt (KATZ (51); LUDENS (75); MARVER (77)), um bis zu 30% gegenüber normalen Tieren (JØRGENSEN (46)).

Bei der Untersuchung des Homogenats hatte die Aldosteronsubstitution auf die Enzymaktivität keinen Einfluß, während in der Vesikelmembranfraktion eine signifikante Erhöhung der Na^+-K^+-ATPase beobachtet werden konnte. Hier soll nun zunächst der Aspekt der Membranzugehörigkeit behandelt werden und im weiteren die Frage des Aldosteronwirkortes und eine Hypothese zur Hormonwirkung auf die Na^+-K^+-ATPase diskutiert werden.

Es ist zu untersuchen, ob das Hormon die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität der Membranen steigert, oder ob es eine durch Adrenalektomie verminderte Aktivität auf das normale Niveau anhebt. Bei früheren Untersuchungen (Übersicht bei MARVER (77)), die sich mit dem fehlenden Einfluß des Aldosterons auf die Na^+-K^+-ATPase in normalen Nieren befaßten, wurde die zweite Möglichkeit in Betracht gezogen. Ein Na^+-K^+-ATPase-Einbau in die Bürstensaummembran oder eine Freigabe von Reaktionsorten an der apikalen Membran wurde ausgeschlossen (KATZ (51)).

Eine Erklärung für die Erhöhung der Na^+-K^+-ATPase-Aktivität bei gleichbleibender Enzymaktivität pro Flächeneinheit ist durch einen erhöhten Anteil an basal-lateraler Membran in der Bürstensaumpräparation gegeben. Dies kann durch eine Veränderung des Sedimentations- und Aggregationsverhaltens aufgrund der Aldosteronwirkung geschehen, so daß sich mehr freie basal-laterale Membranstücke mit der Microvillipräparation anreichern.

Auch der Zusammenhalt der Zellwände könnte sich erhöhen, wodurch größere basal-laterale Flächen an den Microvillimembranen haften blieben. WADE (120) konnte bei morphometrischen Untersuchungen einen um 90-140% vergrößerten Anteil der basal-lateralen Zellwand im distalen Tubulus unter Mineralocorticoiden feststellen. QUIGLEY (90) hatte bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Bürstensaumpräparation einen deutlichen Anteil anhängender basal-lateraler Membranen gefunden. Eine Erhöhung des basal-lateralen Flächenanteils zum apikalen kann bei gleicher Trennschärfe der Differentialpräparation den Anteil der basal-lateralen Verunreinigung in der Vesikelpräparation erhöhen. Die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase mußte zurückgehen, da sie auf eine größere Proteinmenge bezogen wird. In unserer Präparation war kein Unterschied in den spezifischen Aktivitäten der alkalischen Phosphatase bei hormondeprivierten und -substituierten Tieren feststellbar. Aus diesem Grund kann eine Erhöhung der Na^+-K^+-ATPase-Aktivität in der Präparation nicht die Folge eines erhöhten Flächenanteiles der basal-lateralen Membranen sein.

Den Tab. 10 und 11 ist zu entnehmen, daß sich die Mg^{2+}-ATPase und die Na^+-K^+-ATPase in den Vesikelfraktionen aldosteronsubstituierter Tiere gleichsinnig angereichert haben mit relativen spezifischen Aktivitäten von 1,8 bzw. 2,0. Bei den Kontrolltieren ist kein Unterschied der Mg^{2+}-ATPase-Aktivität gegenüber den aldosteronsubstituierten Tieren zu beobachten. Die relative spezifische Aktivität der Na^+-K^+-ATPase fällt auf 0,9. Die Mg^{2+}-ATPase ist in der apikalen und basal-lateralen Zellwand in gleicher Verteilung zu finden (HEIDRICH (38); SCHMIDT (98)), während die Na^+-K^+-ATPase nur in der basal-lateralen Wand lokalisiert ist (PETERS (88); SKRIVER (107)). Bei gleichem Verunreinigungsgrad, gemessen an der Mg^{2+}-ATPase-Aktivität, ist eine Reduktion

der Na^+-K^+-ATPase zu beobachten in den Membranen hormondeprivierter Tiere gegenüber hormonsubstituierten Tieren.

Über den Einfluß der Aldosteronsubstitution auf die Na^+-K^+-ATPase-Aktivität der Niere gibt es unterschiedliche Auffassungen. Durch Bindungsstudien mit radioaktivem Aldosteron wurde der Hauptwirkort im distalen Tubulus lokalisiert (DOUCET (20); FARMAN (31)), wobei eine Wirkung von Aldosteronmetaboliten in den einzelnen Nephronabschnitten noch unklar ist (MORRIS (82)). HORSTER (43) fand in mikrodissezierten distalen Tubuli der Kaninchenniere durch Adrenalektomie einen Abfall der Enzymaktivität auf 45 nMol/min x mg Prot. Diese Aktivität wurde durch Hormonsubstitution 60 bis 90 Minunten nach der Applikation auf das Fünffache entsprechend den Werten normaler Tiere angehoben. Im corticalen Sammelrohr fiel die Aktivität der Na^+-K^+-ATPase nach Adrenalektomie von 77 auf 10 nMol/min x mg Prot. Zu entgegengesetzten Ergebnissen kam DOUCET (21). Er fand keinerlei Stimulation der Na^+-K^+-ATPase am distalen Tubulus contortus und corticalen Sammelrohr von Mäusennieren im Zeitraum von 1 - 3 Stunden nach Aldosterongabe. Möglicherweise führte der Versuchsaufbau von DOUCET (22) - Vorbehandlung mit Kollagenase, Gefrierschock, höherer ATP-Bedarf - zu einem abweichenden Ergebnis. Ein Na^+-K^+-ATPase-Abfall nach Adrenalektomie auf ein Siebtel der Ausgangsaktivität sowie eine Wiederherstellung dieses Wertes 90-180 Minuten nach Aldosterongabe bei corticalen Sammelrohren von Kaninchen wurde von PETTY (89) berichtet.

Unsere Befunde sind mit den Ergebnissen von HORSTER (43) und PETTY (89) vergleichbar. Die von HORSTER (43) und PETTY (89) gefundenen Aktivitätssteigerungen von 500 - 700% lassen sich gut mit der von uns gefundenen Verdoppelung der Enzymaktivität vereinbaren. Die angewandte Vesikelpräparation ist eine Mischung proximaler und distaler Membranen (ANDREWS

(1)), bei der 20% der begleitenden Na^+-K^+-ATPase-Aktivität aus aldosteronsensiblen distalen Zellen stammen. Einer Versechsfachung der Aktivität bei HORSTER (43) und PETTY (89) entspricht die in unseren Versuchen gefundene Verdoppelung der Gesamtaktivität.

Über den Mechanismus der aldosteronbedingten Aktivitätssteigerung der Na^+-K^+-ATPase in unseren Versuchen können wir nur Mutmaßungen anstellen, die durch weitere Untersuchungen erhärtet oder verworfen werden müssen. Die Halbwertzeit der Na^+-K^+-ATPase beträgt mehrere Tage, mit einem Enzymumsatz von 12-14% pro Tag in der Niere (EDELMAN (24); KATZ (50)). Eine de-novo-Synthese des Enzyms als Ursache der Aktivitätssteigerung 3 Stunden nach Hormonapplikation erscheint unwahrscheinlich und bei den kurzfristigen Regelungsvorgängen in der Niere unphysiologisch. Möglicherweise tritt eine Aktivitätsregulierung durch Hemmstoffe ein, z.B. durch das Freisetzen latenter Reaktionsorte. PETERS (88) beobachtete in hochgereinigter Na^+-K^+-ATPase einen Rest von 3-4% an Phospholipiden, der sich nicht von den Enzymuntereinheiten trennen ließ. ROELOFSEN (93) konnte zeigen, daß in der Kaninchenniere Phosphatidylinosit als Lipidaktivator der Na^+-K^+-ATPase wirkt. Eine Wirkung des Aldosterons auf Membranphospholipide ist bekannt. GOODMAN (34) konnte aldosteronabhängige Veränderungen der Phospholipide in der basal-lateralen Membran der Krötenblase nachweisen. KIRSTEN (67) fand eine Beeinflussung des Fettsäuremetabolismus der Membranphospholipide durch Aldosteron in der Rattenniere. Zusammenfassend kommt man zur folgenden Hypothese: Das Aldosteron bewirkt eine Aktivitätsregulierung der Na^+-K^+-ATPase durch Veränderung der Phospholipide in der Tubuluszellwand. Diese Phospholipide aktivieren das Na^+-K^+-ATPase-Molekül.

Eine Bestätigung dieser Hypothese kann durch Untersuchung des Phospholipidgehalts hochgereinigter Na^+-K^+-ATPase bei

Adrenalektomie und nach Aldosteronsubstitution erfolgen. Die ultrastrukturelle Untersuchung des kristallisierten Enzyms (SKRIVER (107)) wird möglicherweise über hormonbedingte Konformationsänderungen Aufschluß geben.

5.5 Kinetik der Natrium-Aufnahme

5.5.1 Intravesikuläres Volumen

Aus den elektronenmikroskopischen Bildern wurden die Abmessungen der Vesikel entnommen: sie haben Durchmesser von 0,5-5 µm und eine Wanddicke von ca. 0,05 µm (s. Kapitel 3.2.1). Unterstellt man vereinfachend eine reine Kugelgestalt, so läßt sich aus diesen Maßen und der Formel für Kugelinhalt $V=3/4\ r^3\pi$ und Kugeloberfläche $F=4r^2\pi$ der Größenbereich der Vesikel errechnen. Das Volumen eines einzelnen Vesikels liegt zwischen $0{,}065 \times 10^{-9}$ und 65×10^{-9} µl, mit einer Oberfläche von 0,8 bis 80 μm^2. Die Oberfläche in Verbindung mit der Wanddicke ergibt ein reines Membranvolumen der umschließenden Hülle von $0{,}04 \times 10^{-9}$ bis 4×10^{-9} µl. Die Membrandichte wurde mit der des Wassers gleichgesetzt, d.h. $\rho_{Membran} = 1$ mg/µl. Aus Membranvolumen und -dichte ergeben sich für die Masse m des Einzelvesikels 0,04 bis 4×10^{-6} µg, da $m = \rho \times V$.

Im Inkubationsvolumen von 100 µl Lösung pro Filtereinsatz waren ca. 120 µg Membranprotein enthalten ($\bar{x}$ = 122 µg $\pm$ 42 S.D.). Aus dem eingesetzten Gesamtprotein und dem Proteingehalt des Einzelvesikels läßt sich durch einfache Division die Anzahl der Vesikel im Inkubat bestimmen:

$$\text{Vesikelanzahl} = \frac{\text{Gesamtprotein}}{\text{Protein d. Einzelvesikels}}$$

Nach Einsetzen ergibt sich eine Vesikelzahl von

$$\frac{120\ \mu g}{0{,}04 \times 10^{-6}\ \mu g} \text{ bis } \frac{120\ \mu g}{4 \times 10^{-6}\ \mu g} \text{ in der Inkubationslösung,}$$

d.h. 3×10^{9} bis 3×10^{7} Vesikel. Auf einen Vesikel entfällt, wie oben berechnet, ein Volumen von $0{,}04 \times 10^{-9}$ bis 4×10^{-9} µl, so daß im Inkubat ein gesamtes intravesikuläres Volumen von ca. 0,12 µl angenommen werden kann. Bezieht man dieses Volumen auf das eingesetzte Protein von 120 µg, so ergibt sich ein Wert von 1 µl/mg Prot. BERNER (9) ermittelte ein intravesikuläres Volumen von 1,2 µl/mg Protein. EVERS (26) fand 1,2 bzw. 3,2 µl/mg Protein und BARAC-NIETO (5) 3,7 µl/mg Protein. Die Übereinstimmung der Ergebnisse spricht für die Validität der verwendeten Prämissen, da bei den erwähnten Autoren das intravesikuläre Volumen nicht aus der morphologischen Analyse, sondern indirekt über die Gleichgewichtskonzentrationen der inkubierten Substrate ermittelt wurde. Die tatsächliche Größe des intravesikulären Raums ist, bezogen auf die reine Vesikelmembranmenge, vermutlich noch höher, da auch das verunreinigende Fremdprotein und die nicht vesikulierten Membranteile in die Berechnung mit eingegangen sind.

5.5.2 Intravesikuläre Na^+-Konzentration

Bei den verwendeten Konzentrationen des Inkubationspuffers Beta (100 mM Mannit, 50 mM Na_2SO_4, 50 mM HEPES/TRIS, $3{,}2 \times 10^{-5}$ mM H^+ bei pH 7,5) und des Puffers Gamma in den Vesikeln (100 mM Mannit, 20 mM HEPES/TRIS, 4×10^{-5} mM H^+ bei pH 7,4) ist, unter Berücksichtigung der fixierten Anionen an der Innenseite der Membran (STECK (117)), mit einer asymmetrischen Ionenverteilung zu rechnen. Es ist wahrscheinlich, daß sich im Gleichgewichtszustand eine höhere Na^+-

Konzentration in den Vesikeln gegenüber dem umgebenden Medium ausbildet, da im wesentlichen nur Na^+ und SO_4^{--} zum Ausgleich des osmotischen Gradienten zur Verfügung stehen. Bei unseren Inkubationen erhielten wir einen globalen Wert für die Na^+-Aufnahme pro Einheit Vesikelprotein. Bei den Inkubationen stellte sich ein Gleichgewicht ein, bei dem das intravesikuläre Natrium gegenüber der Konzentration des Inkubationsmediums erhöht blieb, wenn die Natrium-Aufnahme pro Proteinmenge auf das hiervon unabhängig ermittelte intravesikuläre Volumen bezogen wird.

Eine Umrechnung in Absolutwerte für die Na^+-Konzentration in den Vesikeln ergäbe im Gleichgewicht bei pH 7,5 ca. 900 nMol/µl entsprechend 900 mMol/l, bei suboptimalen pH-Werten ca. 200 nMol/µl entsprechend 200 mMol/l. Es ist eine Na^+-Anreicherung in den Vesikeln zu erwarten. Da deren absolute Höhe direkt vom zugrunde gelegten Vesikelvolumen mit dessen Bestimmungsunsicherheit abhängt, muß die abgeleitete intravesikuläre Na^+-Konzentrationsangabe zurückhaltend beurteilt werden.

Bei asymmetrischen Ionengradienten ist mit dem Auftreten einer Donnan-Verteilung an der Vesikelmembran zu rechnen, die mit einer Potentialdifferenz einhergeht (HÖFER (41)). Eine experimentelle Ableitung dieser Potentiale könnte den vorliegenden Sachverhalt genauer untersuchen, da sich aus der bekannten Potentialdifferenz und den extravesikulären Ionenkonzentrationen die intravesikulären Konzentrationen bestimmen lassen. Einen Schritt in diese Richtung bedeutet die Versuchsanordnung von WRIGHT (129). Der Autor inkubierte Vesikel unter den Bedingungen verschiedener K^+-Gradienten, wobei das Membranpotential aus der Nernstschen Formel (HARPER (37)) berechnet wurde. Durch Zusatz der Ionophoren Valinomycin und Carbonyl-Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon FCCP wurde ein "chemischer Kurzschlußstrom" erzeugt und als Referenzwert verwendet. In vivo ist an der apikalen

Tubulus-Membran 1 mM Na^+ zur Erhaltung des gleichen Potentialdifferenz-Niveaus wie 150 mM Na^+ ausreichend (WARNOCK (125)). Erst eine Methode zur direkten intravesikulären Konzentrationsbestimmung der Elektrolyte wird eine sichere Aussage über die tatsächlichen Verhältnisse ermöglichen.

5.5.3 Natrium-Fluß

Für eine Membranfläche läßt sich Dichte = Masse : Volumen umformen in Dichte = Masse : (Oberfläche x Schichtdicke) und auflösen nach Oberfläche = Masse : (Dichte x Schichtdicke). Nach Einsetzen der Werte für 100 µl Inkubat (s. Kapitel 4.3.1) ergibt sich die darin enthaltene Membranoberfläche:

$$\text{Oberfläche} = \frac{120\ \mu g}{1\ mg/\mu l \times 0{,}05\ \mu m} =$$

$$= \frac{120\ \mu g}{1000\ \mu g/10^9\ \mu m^3 \times 0{,}05\ \mu m} =$$

$$= 2{,}4 \cdot 10^9\ \mu m^2 = 24\ cm^2.$$

Daraus resultiert eine Membranfläche von ca. 20 cm^2/mg Protein. Bezieht man die bei optimalen pH-Verhältnissen erzielten initialen Na^+-Aufnahmeraten von ca. 900 nMol/mg Prot. x 2sec auf diese Fläche, erhält man einen initialen Na^+-Fluß von 22,5 nMol/cm^2 x sec.

Zur Beurteilung dieses Ergebnisses soll im Folgenden mit aller Vorsicht eine Modellumrechnung auf menschliche Verhältnisse durchgeführt werden. Die menschlichen Nieren wiegen zusammen ca. 300 g (WALDEYER (121)). Unterstellt man die gleiche Ausbeute bei der Präparation (10 mg Bürstensaummem-

bran pro 10 g Nierengewebe), so wären von 300 g Nierengewebe entsprechend 300 mg Bürstensaummembran zu erwarten. Aus der Ausbeute der alkalischen Phosphatase von 10% (s. Kapitel 4.2.2.1) läßt sich die vorhandene Bürstensaummembranmenge auf das Zehnfache, d.h. auf 3000 mg schätzen. Bei einer Fläche von 20 cm^2/mg Prot. (s.o.) ergäbe sich eine Fläche von ca. 60000 cm^2 = 6 m^2 apikaler Tubulusmembran beim Menschen. Diese Fläche wäre in Beziehung zur bekannten Na^+-Rückresorption der menschlichen Nieren zu setzen, die ca. 24140 mMol/die beträgt (DEETJEN (18)). Der Na^+-Fluß müßte

$$\frac{24140 \cdot 10^6 \text{ nMol}}{60000 \text{ cm}^2 \cdot 24 \cdot 60 \cdot 60 \text{ sec}} = 4{,}7 \text{ nMol/cm}^2 \cdot \text{sec}$$

betragen. Diese Modellrechnung geht von einem kontinuierlichen Na^+-Fluß über Zeit- und Flächeneinheit aus. Sie stellt eine grobe Vereinfachung dar. Aus der Nierenphysiologie ist bekannt, daß die Na^+-Rückresorption im Verlauf des Nephrons variiert (DEETJEN (18)). Die durchgeführte Berechnung erlaubt eine Abschätzung von Größenordnung und Variationsbreite des Ergebnisses bei Annahme anderer Ausgangsgrößen. Bei aller Vorsicht läßt sich sagen, daß das Ergebnis unserer Na^+-Aufnahmeversuche in den Bereich der zu erwartenden physiologischen Größenordnung fällt.

Für die genauere Klärung dieser Frage und gegebenenfalls die direkte Verifizierung der angegebenen Prämissen erscheint es aussichtsreich, diese Versuche mit Humannieren zu wiederholen, z.B. durch Verwendung von intakten Nierengewebebezirken aus exstirpierten Tumornieren.

Es ist daran zu erinnern, daß der größte Teil der durchgeführten Versuche an Nierenmembranen nach Adrenalektomie vorgenommen wurde und nur eine kleinere Na^+-Aufnahmeserie an Nierenmembranen normaler Tiere. Bei der letztgenannten Ver-

suchsserie (s. Kapitel 3.1.3.2) resultierte eine vergleichbare Na^+-Anfangsaufnahme (ca. 850 nMol/mg Prot. nach 2 sec.), die allerdings im Untersuchungszeitraum auf deutlich höhere Werte zunahm.

Aus Mikropunktionsuntersuchungen wurde bekannt, daß im proximalen Konvolut bereits 60% des tubulären Na^+ innerhalb von 7 bis 10 sec. resorbiert werden, mit einer Passagezeit bis zum Ende des Sammelrohrs von weniger als 2 Minuten (DEETJEN (18)). Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse über den zeitlichen Verlauf der Na^+-Aufnahme mit einer Aufnahmekinetik zwischen 0 und 10 Sekunden und einem Gleichgewichtszustand ab 15 Sekunden nach Inkubationsbeginn stehen mit den von DEETJEN (18) gemachten Beobachtungen im Einklang.

Da es noch keine standardisierten Versuchsbedingungen für Na^+-Aufnahmeversuche in Nierenmembranvesikel gibt, sind die Ergebnisse verschiedener Autoren sehr schwer vergleichbar. In Tab.12 wird die große Variationsbreite der Na^+-Aufnahme deutlich. Die Na^+-Aufnahmeraten dieser Tabelle wurden aus den Originalarbeiten errechnet. Dabei wurde eine lineare Aufnahme bis zur ersten Messung angenommen. Die Anordnung erfolgte nach steigenden Aufnahmewerten. "Overshoot" ist eine überschießende Aufnahme zum Zeitpunkt t in Prozent bezogen auf den Endwert. Eingeklammerte Werte weisen darauf hin, daß für die überschießende Aufnahme ein Co-Substrat erforderlich war, und die Spalte "Zeitraum" gibt den Bereich an, in dem die wesentliche Na^+-Aufnahme erfolgte. Es ist ersichtlich, daß sich die Ergebnisse um mehrere Größenordnungen unterscheiden, ebenso fällt eine große Schwankungsbreite des zeitlichen Verlaufs auf. Die Angaben über die Glucose-Aufnahme (pMol/mg Prot. x sec.) zeigen eine geringere Streubreite:

CRANE (17)	2
SLACK (108)	5,3
SACKTOR (96)	5,3
BARAC-NIETO (5)	7 - 80
MURER (84)	10 - 53
KESSLER (54)	14 - 130
KINNE (58)	160

Die Abschätzung der Transportrate aus filtriertem Glucose-Load/die ergibt deutlich höhere Erwartungswerte. Als mögliche Ursachen für die große Streubreite der Versuchsergebnisse bei den Na^+-Aufnahmen kommen folgende Faktoren in Betracht. Stellvertretend für die erheblichen Unterschiede im Versuchsansatz sind in der Tab. 12 die Na^+-Konzentrationen der jeweiligen Inkubationsmedien angegeben. Es variieren außerdem Membranpräparationsmethode, Osmolarität, Ionenstärke, verwendetes Anion, evtl. cotransportiertes Substrat und pH-Werte der Medien, mit denen die Vesikel beladen und zur Inkubation gebracht werden. Die mögliche Bedeutung unterschiedlicher Na^+-Konzentrationen ist aus den Untersuchungen von WRIGHT (129) ersichtlich. Er machte für den Na^+-Succinat-Cotransport die Beobachtung, daß bei stufenweiser Verminderung des Na^+-Gehaltes im Inkubationspuffer (von 100 mM auf 0 mM) eine Reduktion der Succinat-Aufnahme auf 1/700 des Ausgangswertes zu verzeichnen ist. Von den beobachteten Membranmeßwerten kann man nicht ohne Zweifel auf die in vivo bedeutsame Höhe der Na^+-Resorption der Tubulusbürstensäume schließen.

5.5.4 Gegentransport

Bei den in Tab.12 dargestellten Werten lassen sich neben den Unterschieden der Na^+-Aufnahmehöhe Ähnlichkeiten im Aufnahmekurvenverlauf erkennen, wie das mit "overshoot"

Tab. 12: Literaturübersicht zu Na^+-Aufnahme in Nierenmembranvesikel (s. Text)

(BS = Bürstensaum)

Autor	Membran	Na-Aufnahmerate (nMol/mg*sec)	Max. Aufnahme (nMol/mg)	t	"Over-shoot" (%)	Na^+ (mM)	Zeit-raum
CRANE (17)	Proteolipo-somen aus BS/ Rattenniere	0,0016-0,0042	0,3-0,5	15 Min	Ø	150	1-15 Min
SACKTOR (96)	Niere BS	0,027	90	10-20 Min	(150-300)	?	30 sec bis 20 Min
COHN (15)	Niere BS/ Hund	0,025-0,15	2-5	5-10 Min	(250)	1	20 sec bis 15 Min
BARAC-NIETO (5)	Niere BS/ Ratte	0,13	19,3	(+15 sec)	(12)	5	5 sec bis 60 sec
MURER (83)	Niere BS/ Ratte	0,07-0,2	2,5-5	2 Min	(100)	1	15 sec bis 6 Min
KINNE (58)	Niere BS/ Ratte	1,8	5,3	10 Min	Ø	100	15 sec bis 10 Min
WIRGHT (129)	Niere BS/ Kaninchen	2-5	18-35	60 sec	Ø	30	1 sec bis 60 sec
Eigene Unter-suchung	Niere BS/ Ratte	450	1400-1700	4-10 sec	150	88	2 sec bis 10 sec

gekennzeichnete Phänomen einer initial überschießenden Aufnahme über die Gleichgewichtsbedingungen hinaus. Eine überschießende Aufnahme trat bei solchen Versuchen auf, bei denen mit dem Natrium-Ion noch ein anderes Substrat inkubiert wurde. Bei SACKTOR (96) war dies Prolin, COHN (15) verwendete Protonen, BARAC-NIETO (5) L-Lactat, MURER (84) Protonen und WIRGHT (129) Succinat. Ein Cotransport wurde an Rattennierenvesikeln auch für Phenylalanin/Na^+ (EVERS (27)) und für D-Glucose/Na^+ (KINNE (58)) beschrieben. Auch aus Untersuchungen an Bürstensaumvesikeln des Rattendarms, die z.T. von den bisher genannten Autoren, aber auch von HOPFER (42) und KESSLER (54) durchgeführt wurden, ist ein D-Glucose/Na^+-Cotransport bekannt. Die von uns gefundene überschießende Na^+-Aufnahme unter den Bedingungen physiologischer Na^+- und H^+-Gradienten (s. Kapitel 4.4 Na^+/H^+-Antiport) entspricht im Verlauf der Aufnahmekinetik den von MURER (83) und COHN (15) berichteten Ergebnissen für Na^+/H^+-Inkubationen. Der Verlauf einer solchen Aufnahme ist in der Membranphysiologie als Gegentransportsystem gekennzeichnet worden (HÖFER (41)), kann aber auch auf osmotischen Schwellungs- und Schrumpfungsvorgängen beruhen (KINNE (58)). Aus dem Transfer der Vesikel in die hypertone Inkubationslösung wäre eine Verminderung des intravesikulären Volumens mit geringerer Na^+-Aufnahme denkbar und alle Versuchsserien müßten gleichermaßen betroffen sein. Da in unseren Inkubationen eine deutliche Wirkung der sicher nicht osmotisch ins Gewicht fallenden Protonen-Gradienten nachweisbar ist, erscheint die Erklärung des "Overshoots" als Gegentransportmaximum zutreffend. Die Frage ließe sich klären, wenn der Protonengradient durch gleichen pH-Wert von Vesikellumen und Inkubationspuffer, oder durch Einsatz von Ionophoren wie Carbonylcyanid-p-fluoromethoxyphenylhydrazon ersetzt würde (MURER (83)). Unter diesen Umständen müßte der "Overshoot" der Na^+-Aufnahme verschwinden. Möglicherweise kann der Gegentransportanteil der Na^+-Aufnahme durch Vorinkubation der

Vesikel in einer höheren Konzentration von Na^+ und anschließender Inkubation in niedrig konzentrierter Lösung radioaktiv markierten Natriums gesteigert werden. Dieser Ansatz hat sich in Zuckertransportstudien bewährt (HÖFER (41)). Beim Natriumtransport stellt sich allerdings das Problem der Polarität des Ionentransports durch die Bürstensaummembran. Diese Frage könnte durch Verwendung von Amilorid zur selektiven Blockierung des luminalen Na^+-Einstroms weiter untersucht werden (PETTY (89)).

5.6 Einfluß verschiedener Na^+-Protonen-Gradienten auf die Natrium-Aufnahme

Die Abb. 20 bis 22 zeigen Versuche, bei denen durch Variation der Na^+-Protonen-Gradienten der Einfluß auf die Kinetik und Höhe der Natrium-Aufnahme geprüft wird: Besteht ein Na^+-Protonen-Antiport, so kann bei einem Protonen-Gradienten von intra- nach extravesiculär Na^+ erleichtert von extra- nach intravesiculär im Austausch gegen H^+ diffundieren.

In unseren Versuchen repräsentiert bei der Inkubation der Gamma-Puffer die intravesiculären und der Beta-Puffer die extravesiculären Verhältnisse. Beim Spülvorgang entspricht Alpha dem extravesiculären Milieu. Es ist denkbar, daß eine geringere Protonendichte außerhalb der Vesikel das Auswaschen intravesiculären Natriums verhindert.

Bei den Versuchspaaren 20 I/II, 20 III/IV und 21 I/II sind die Bedingungen bis auf den pH des Spülpuffers identisch. Der tatsächliche intravesiculäre pH-Wert am Ende des Inkubationsvorganges müßte zwischen den pH-Werten von Beta-Puffer und Gamma-Puffer liegen. Die Aufnahmekurven der drei oben genannten Versuchspaare zeigen bezüglich eines Na^+-Protonen-Antiports beim Spülvorgang widersprüchliche Ergebnisse.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß alle Kurven der Abb. 20 eine initiale Kinetik aufweisen, die mit dem in Kapitel 5.5 beschriebenen Natrium-Aufnahmeverhalten zu vereinbaren sind, daß aber ein Natrium-Protonen-Antiport beim Spülvorgang keine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

Ein Grund könnte in der Geschwindigkeit liegen, mit der der Spülvorgang abläuft. Zudem wurde der Spülpuffer auf Eis gekühlt, um durch niedrige Temperaturen möglichst sämtliche Diffusionsvorgänge mit der Spülung zu stoppen. Außerdem können andere, die Natrium-Aufnahme bestimmende Einflüsse die Auswirkung des Spülvorganges überwiegen.

Der Einfluß der Protonenverhältnisse bei der Natriuminkubation sind in den Versuchsgruppen 20 I/II, 20 III/IV/V, 20 VI und 20 VII, sowie in 21 III, zusammenfassend in Abb. 22 zu beobachten. Hier entspricht Gamma als Präparationslösung dem intrazellulären pH, Beta als Inkubationslösung dem tubulären. Beim Na^+-Protonen-Antiport müßte die höchste Natrium-Aufnahme dann stattfinden, wenn der Protonengradient von intra- nach extravesiculär am größten ist. Diese Bedingungen sind bei 20 VII und 21 I und II gegeben; doch nicht hier, sondern bei 20 VI und 21 III findet die höchste Natrium-Aufnahme statt. Eine Erklärung dieses Befundes liegt in der Möglichkeit, daß andere Faktoren das Ergebnis verursachen.

In unseren Versuchen wurde der pH-Wert des Gamma-Puffers dem intrazellulären pH-Wert 7,4 angeglichen. Den pH-Wert des Beta-Puffers variierten wir in dem Bereich der physiologischen Harnansäuerung zwischen 4,0 und 8,2. Auffallend ist, daß die höchsten Natrium-Aufnahmen bei den pH-Werten Gamma 7,4, Beta 7,5 und Alpha 7,5 erzielt wurden. Auch die Triton-Versuche bestätigen diesen Befund (siehe Abb. 25, 26).

Die Kurvenverläufe sind mit der Kinetik eines "Overshoots" zu vereinbaren (siehe Kap. 5.5.4). Die teilweise Wirksamkeit

des Na^+/H^+-Gradienten wurde inzwischen von SCHWARTZ (101); COHN (15); STANTON (116) und WARNOCK (125) bestätigt. SCHWARTZ (101) arbeitete mit der Mikroperfusionstechnik und maß intratubuläre pH-Veränderungen bei variierenden Na^+-Verhältnissen intrazellulär versus intratubulär. COHN (15) verwendete die Filtrationstechnik mit Bürstensaumvesikeln von niereninsuffizienten Hunden, STANTON (116) benutzte die Mikroperfusionsmethode im distalen Tubulus mit Perfusionsflüssigkeiten verschiedener pH-Werte bei konstantem Säure-Basen-Haushalt und bei konstantem Perfusions-pH mit wechselnd systemischer Alkalose bzw. Azidose.

Bei STANTON (116) lagen die intrazellulären pH-Werte zwischen 7,1 und 7,5; die Tubulusflüssigkeit hatte den pH-Wert von 6,5. Bei den Perfusionsversuchen schwankte der pH-Wert der Lösungen zwischen 6,5 und 8,0. Der niedrigste intrazelluläre pH-Wert von WARNOCK (125) betrug 5,9, der extrazelluläre nicht unter 6,1. Der niedrigste von SCHWARTZ (101) gemessene intratubuläre pH-Wert betrug 6,45.

Möglicherweise liegt die optimale absolute Natriumaufnahme bei 20 VI und 21 III daran, daß die isolierten Microvillimembranen überwiegend dem proximalen Tubulus entstammen, in dem noch keine allzu großen pH-Sprünge im Vergleich zum Blut-pH vorkommen. Im proximalen Tubulus werden zwar quantitativ die meisten H^+-Ionen ausgeschieden, doch auch eine erhebliche Menge Bikarbonat resorbiert, so daß hier nur eine geringfügige Absenkung des tubulären pH-Wertes stattfindet (Delta-pH ca. 0,2). Die eigentliche Harnansäuerung wird, entsprechend der metabolischen Lage des Organismus, nach dem distalen Konvolut vollzogen. Eine Wiederholung der Versuche mit geringeren pH-Variationen des Beta-Puffers (zwischen 7,1 und 7,7) wäre anzustreben.

5.7 Einfluß des Aldosterons auf die Natrium-Aufnahme der Büstensaummembranvesikel

Den Einfluß von Aldosteron auf die Natrium-Aufnahme der Bürstensaummembranvesikel dokumentiert die Abb. 18 (siehe Kap. 5.6).

Bei den Versuchen herrschen physiologische pH-Bedingungen (7,4/7,5/7,5). Es zeigt sich, daß bei den hormonbehandelten Membranen die maximale Natrium-Aufnahme höher liegt und später erfolgt als bei den nicht-hormonsubstituierten. Die Tendenz läßt sich auch in den Versuchen mit verschiedenen pH-Variationen nachvollziehen (siehe Abb. 20). In der Plateau-Phase ist ein signifikanter Unterschied in der Natrium-Aufnahme hormondeprivierter und homonsubstitutierter Membranvesikel nicht mehr nachweisbar. Die Aufnahmekurve von Membranen nicht-adrenalektomierter Ratten (siehe Abb. 19) zeigt ein späteres und höheres Aufnahmemaximum als die von Membranen adrenalektomierter und Aldosteron-substituierter Ratten.

In Abb. 18 sieht man eine Annäherung der Natrium-Aufnahme von nicht-hormonsubstituierten über hormonsubstituierte Tiere zu den Normalbedingungen unbehandelter Tiere (siehe Abb. 20). Die sofortige, überschießende Reaktion der adrenalektomierten Tiere bei der Na^+-/K^+-Ausscheidung nach Aldosteronsubstitution spricht für eine gute Hormonwirksamkeit an der Nierenzelle.

Bei der Zugrundelegung des Ussing-Skou-Modells (siehe Kap. 2.2) läßt sich die beobachtete, relativ geringe Steigerung der Natrium-Aufnahme durch Aldosteron folgendermaßen verstehen:

Wenn basal-laterale Pumpen und energiebereitstellende Systeme wesentliche Wirkorte des Aldosterons sind, konnte an isolierten lumenzugewandten Membranen nur ein Teil des Hormoneffekts nachgewiesen werden. Aus Substratmangel konnten in der gewählten Versuchsanordnung zur Natrium-Inkubation keine aktiven Transportprozesse ablaufen.

Eine hormonbedingte Permeabilitätserhöhung kann die beobachtete Steigerung der Natrium-Aufnahme unter Aldosteron erklären. Da aber lediglich 2 bis 3% der Gesamt-Natrium-Resorption des Tubulus durch Aldosteron reguliert werden (DEETJEN (18)), ist nur bei einer hochselektiven Präparation von Membranen aldosteronabhängiger Zellen zu erwarten, daß sich die hormonabhängige Natrium-Resorption deutlich zeigt.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Befunde über den Hauptwirkort des Aldosterons in der Literatur widersprüchlich sind (DEETJEN (18); HIERHOLZER (40); NICKOLSON (85); SONNENBLICK (112)). Mit der Präparation von Microvilli erhielten wir überwiegend Membranen aus dem proximalen Tubulus und nur in geringerem Ausmaß aus dem distalen Tubulus (ANDREWS (1)). Neuere Arbeiten lassen es fraglich erscheinen, ob hauptsächlich Membranen von aldosteronabhängigen Tubuluszellen isoliert wurden: EDELMANN (24) geht von einer Lokalisation der Aldosteronrezeptoren an Zellen des distalen Tubulus aus, DOUCET (20) fand die Hormonbindung beim Kaninchen an Zellen der Sammelrohre. SCHOLER (100) und BONVALET (11) lokalisierten den Wirkort von Aldosteron bei Ratten vor allem im distalen Konvolut und in den corticalen Sammelrohren. Letztgenannte Wirkorte werden auch von FARMAN (31) bestätigt.

Am ausführlichsten geht KAISSLING (48) auf die Frage der Mineralocorticoidabhängigkeit einzelner Zellen ein. Hier werden strukturelle Aspekte adaptiver Veränderung von Tubu-

luszellen distal der Macula densa untersucht, wobei das Nephron in drei Abschnitte unterteilt wird:

1. DCT = distal convoluted tubule, entsprechend der Pars contorta II. Ordnung,
2. CNT = connecting tubule, entsprechend dem Verbindungsstück und
3. CCD = cortical collecting tubule, entsprechend dem corticalen Sammelrohr.

Diese drei distalen Nephronabschnitte bestehen aus vier Zelltypen: der DCT-Zelle, der CNT-Zelle, der I-Zelle (= intercalated) und der P-Zelle (= principal); I- und P-Zellen bilden gemeinsam den CCD und stehen bei der Ratte im Verhältnis 1:2. I-Zellen kommen außerdem im CNT vor und haben die Eigenschaft, den apicalen Zellpol je nach Funktionszustand zu verändern. Dabei vermehren bzw. vermindern sie die an der lumenzugewandten Membran lokalisierten Microvilli. DCT-Zellen haben nur wenige, kurze Microvilli, deren Zahl immer konstant bleibt. CNT und P-Zellen haben noch weniger Microvilli. Ihre luminale Oberfläche beträgt nur 6 bzw. 10% der basal-lateralen Fläche.

Nun korrelierte KAISSLING (48) diese Befunde mit Mikropunktionsergebnissen, bei denen durch verschiedene Elektrolytgehalte von Diäten und durch Hormongabe (DOCA = Desoxycorticosteronacetat) der Funktionszustand der verschiedenen Zellarten des Nephrons beeinflußt wird:

Ein hoher Plasma-Natrium-Spiegel beeinflußt DCT-Zellen, während Mineralocorticoide keinen wesentlichen strukturellen Einfluß ausübten. CNT-Zellen wiesen eine bis zu vierfache Vergrößerung der Membranoberfläche auf, wobei sie auf ein hohes Plasma-Kalium empfindlicher reagierten als auf einen hohen Mineralocorticoidspiegel. I-Zellen zeigten ihre Microvillivermehrung nur bei Hyperkaliämie und Hypoponatriämie.

Sie reagierten nicht auf Mineralocorticoide, während P-Zellen primär auf Mineralocorticoide reagierten und sekundär auf Hyperkaliämie.

Betrachtet man diese Ergebnisse von KAISSLING (48), so ergibt sich die Frage, ob die P-Zellen auch am aldosteronabhängigen Natrium-Transport beteiligt sind. Sollte dies der Fall sein, so ist anzunehmen, daß bei selektiver Präparation luminaler Membranen von P-Zellen bei entsprechenden Permeabilitätsuntersuchungen der Aldosteroneffekt noch deutlicher zu Tage tritt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Bürstensaummembranvesikel aus Tubuluszellen von adrenalektomierten und aldosteronsubstituierten Ratten untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Darstellung, der Enzymbestimmung und der Na^+-Aufnahmeversuche sind:

1. Im transmissions- und rasterelektronenmikroskopischen Bild wiesen die Vesikel Durchmesser zwischen 0,5 und 5 µm auf. Durch Inkubation mit Triton-X-100 wurden sie zu amorphen Membranfragmenten lysiert.
2. Die Enzymaktivität von Lactat-Dehydrogenase und Na^+-K^+-ATPase wurde durch Aldosteron signifikant beeinflußt. Die aldosteronbehandelten Tiere wiesen im Nierenhomogenat gegenüber den Kontrolltieren eine um 13% niedrigere Aktivität der Lactat-Dehydrogenase auf. Bei den Bürstensaummembranen bewirkte das Aldosteron eine Verdoppelung der Na^+-K^+-ATPase-Aktiviät.
3. Die Na^+-Aufnahme der Membranvesikel war abhängig vom intra- und extravesiculären pH. Bei pH_{intra} 7,4 und pH_{extra} 7,5 fand die höchste Na^+-Aufnahme statt.
4. Nach Entwicklung einer neuen Methode für Kurzzeitinkubationen konnten wir den Verlauf der Na^+-Aufnahme in den ersten Sekunden nach Inkubationsbeginn darstellen. Die Na^+-Aufnahme in die Membranvesikel zeigte einen "Overshoot" von 150% des Endwertes; der Gleichgewichtszustand war nach 15 sec. erreicht.
5. Das Maximum der Na^+-Aufnahme lag bei den Membranvesikeln aldosteronsubstituierter Tiere höher und später als bei den Kontrolltieren. Eine kleinere Inkubationsreihe zeigte für Normaltiere noch spätere und höhere Maxima. Dabei lag die Na^+-Aufnahme aller drei Membranpräparationen zum ersten Meßzeitpunkt (2 sec.) bei ca. 800 nVal Na^+/mg Prot.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDREWS PM:
Scanning electron microscopy of human and rhesus monkey kidneys.
Lab Invest 1975; 32:610-618.

2. ARCHAKOV AI, PACHENKO LF, KAPITANOV AB, EFRON II, KNYAZEVA TI, ZHEREBKOVA NS:
A quantitative estimation of degree of purity of preparations of subcellular structures.
Anal Biochem 1973; 54:223-233.

3. AUSIELLO DA, SHARP GWG:
Localization of physiological receptor sites for aldosterone in the bladder of the toad, bufo marinus.
Endocrinology 1968; 82:1163-1169.

4. BAGINSKI FS, FOA P, ZAK B:
Glucose-6-Phosphatase.
In: BERGMEYER HU (Ed.): Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim: Chemie, 1974:909-913.

5. BARAC-NIETO M, MURER H, KINNE R:
Lactate-sodium contransport in rat renal brush border membranes.
Am J Physiol 1980; 239(8):F496-F506.

6. BECKMAN B, GUERTLER B, LEAF R, WITKUM P, SHARP GWG:
Evidence for an apical membrane effect in the regulation of the hexose monophosphate shunt pathway in toad bladder studies with amiloride.
Biochim Biophys Acta 1974; 332:350-357.

7. BEISENHERZ G, BOLTZE HJ, BÜCHER T, CZOK R, GARBADE KH, MEYER-ARENDT F, PFLEIDERER G:
Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase in einem Arbeitsgang.
Z Naturforsch 1953; 8b:555-577.

8. BERGMEYER HU:
Methoden der Enzymatischen Analyse, Bd.I.
Weinheim: Chemie, 1974.

9. BERNER W, KINNE R, MURER H:
Phosphate transport into brush-border membrane vesicles isolated from rat small instestine.
Biochem J 1976; 160:467-474.

10. BODE F, BAUMANN K, KINNE R:
Analysis of the pinocytic process in rat kidney. II. Biochemical composition of pinocytic vesicles compared to brush border microvilli, lysosomes, and basolateral plasma membranes.
Biochim Biophys Acta 1976; 433:294-310.

11. BONVALET JP, FARMAN N, VANDEWALLE A:
Binding sites of aldosterone along the nephron: An attempt of localization by autoradiographic and binding studies on isolated tubules.
Colloq INSERM 1979; 85:113-120.

12. BOOTH AG, KENNY J:
A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney.
Biochem J 1974; 142:575-581.

13. BREWER JM, PESCE AJ, ASHWORTH RB:
Experimentelle Methoden in der Biochemie.
Stuttgart: Fischer, 1977.

14. BURCK HC:
Histologische Technik.
Stuttgart: Thieme, 1973.

15. COHN ED, HRUSKA KA, KLAHR S, HAMMERMAN MR:
Increased Na^+-H^+ exchange in brush border vesicles from dogs with renal failure.
Am J Physiol 1982; 243:F293-F299.

16. CRABBÉ J:
Influence of aldosterone on active sodium transport by the toad bladder: A kinetic approach.
Acta Physiol Scand 1974; 90:417-426.

17. CRANE RK, MALATHI P, PREISER H:
Reconstitution of Na gradient-coupled carrier functions of brush border membranes of intestine and kidney in sonicated liposomes.
In: SEMENZA G (Ed.): Biochemistry of membrane transport. FEBS Symp 42. Berlin: Springer, 1977.

18. DEETJEN P, BOYLAN JW, KRAMER K:
Niere und Wasserhaushalt.
München: Urban & Schwarzenberg, 1976.

19. DESCH HR, JONES LR, WATANABE AM:
Intact vesicles of canine cardiac sarcolemma; evidence from vectorial properties of Na^+, K^+-ATPase.
Circ Res 1976; 39:586-595.

20. DOUCET A, KATZ AI:
Mineralocorticoid receptors along the nephron: (^{3}H) aldosterone binding in rabbit tubules.
Am J Physiol 1981; 241:F605-F611.

21. DOUCET A, KATZ AI:
Short-term effect of aldosterone on Na-K-ATPase in single nephron segments.
Am J Physiol 1981; 241:F273-F278.

22. DOUCET A, KATZ AI, MOREL F:
Determination of Na-K-ATPase activity in single segments of the mammalian nephron.
Am J Physiol 1979; 237:F105-F113.

23. EDELMAN IS:
Mechanism of action of steroid hormones.
J Steroid Biochem 1975; 6:147-159.

24. EDELMAN IS:
Receptors and effectors in hormone action on the kidney.
Am J Physiol 1981; 241:F333-F339.

25. EDELMAN IS, BOGAROCH R, PORTER GA:
On the mechanism of aldosterone on sodium transport: the role of protein synthesis.
Proc Natl Acad Sci USA 1963; 50:1169-1177.

26. EVERS C, HAASE W, MURER H, KINNE R:
Properties of brush border vesicles isolated from rat kidney cortex by calcium precipitation.
Membr Biochem 1978; 1:203-219.

27. EVERS J, MURER H, KINNE R:
Phenylalanine uptake in isolated renal brush border vesicles.
Biochim Biophys Acta 1976; 426:598-615.

28. FANESTIL DD, EDELMAN IS:
Characteristics of the renal nuclear receptors for aldosterone.
Proc Natl Acad Sci USA 1966; 56:872-879.

29. FANESTIL DD:
Mechanism of action of aldosterone.
Annu Rev Med 1969; 20:223-232.

30. FANESTIL DD, HERMAN TS, FIMORGNARI GM, EDELMAN IS:
Oxidative metabolism and aldosterone regulation of sodium transport.
In: Regulatory functions of biological membranes. Biochim Biophys Acta Library Series, Amsterdam: Elsevier, 1968:177-194.

31. FARMAN N, VANDEWALLE A, BONVALET JP:
Aldosterone binding in isolated tubules. I. Biochemical determinations in proximal and distal parts of the rabbit nephron.
Am J Physiol 1982; 242:F63-F68.

32. FELDMAN D, FUNDER JW, EDELMAN IS:
Subcellular mechanisms in the action of adrenal steroids.
Am J Med 51:545-560.

33. FIMOGNARI GM, FANESTIL DD, EDELMAN IS:
Induction of RNA and protein synthesis in the action of aldosterone in the rat.
Am J Physiol 1967; 213:954-963.

34. GOODMAN DBP, ALLEN JE, RASMUSSEN H:
Studies on the mechanism of action of aldosterone: Hormone induced changes in lipid metabolism.
Biochemistry 1971; 10:3825-3831.

35. HABERMEHL A:
Raster-Elektronenmikroskopie.
D Ärztebl 1980; 7:389-392.

36. HAMMER A, HAMMER K:
Physikalische Formeln und Tabellen.
München: Lindauer, 1971.

37. HARPER HA, RODWELL VW, MAYES PA:
Review of physiological chemistry.
Los Altos: Lange, 1979.

38. HEIDRICH HG, KINNE R, KINNE-SAFFRAN E, HANNING K:
The polarity of the proximal tubule cell in rat kidney.
J Cell Biol 1972; 54:232-245.

39. HIERHOLZER K, WIEDERHOLT M, HOLZGREVE H, GIEBISCH G, KLOSE RM, WINHAGER EE:
Micropuncture study of renal transtubular concentration gradients of sodium and potassium in adrenalectomized rats.
Pflugers Arch 1965; 285:193-210.

40. HIERHOLZER K, WIEDERHOLT M, STOLTE H:
Hemmung der Natriumresorption im proximalen und distalen Konvolut adrenalektomierter Ratten.
Pflugers Arch 1966; 291:43-62.

41. HÖFER M:
Transport durch biologische Membranen. Das Konzept der Trägerkatalyse.
Weinheim: Chemie, 1977.

42. HOPFER U, NELSON K, PERROTTO J, ISSELBACHER K:
Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine.
J Biol Chem 1973; 248:25-32.

43. HORSTER M, SCHMID H, SCHMIDT U:
Aldosterone in vitro restores nephron Na-K-ATPase of distal segments from adrenalectomized rabbits.
Pflugers Arch 1980; 384:203-206.

44. HOUSLAY MD, STANLEY KK:
Dynamics of biological membranes.
Chichester: Wiley, 1982.

45. IMMICH H:
Medizinisches Statistik.
Stuttgart: Schattauer, 1974.

46. JØRGENSEN PL:
The role of aldosterone in the regulation of Na-K-ATPase in rat kidney.
J Steroid Biochem 1972; 3:181-191.

47. JUNCQUEIRA LC, CARNEIRO J, CONTOPOULOS AN:
Basic histology.
Los Altos: Lange, 1977.

48. KAISSLING B:
Structural aspects of adaptive changes in renal electrolyte excretion.
Am J Physiol 1982; 243:F211-F226.

49. KARLSON P:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Stuttgart: Thieme, 1972.

50.ATZ AI:
Renal Na-K-ATPase: its role in tubular sodium and potassium transport.
Am J Physiol 1982; 242:F207-F219.

51. KATZ AI, EPSTEIN FH:
Physiologic role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the transport of cations across biologic membranes.
N Engl J Med 1968; 278(5): 253-261.

52. KERR VN, HAYES FN, OTT DG:
Liquid scintillators, 3: The quenching of liquid scintillator solutions by organic compounds.
Int J Appl Radiat Isot 1957; 1:284-288.

53. KESSLER M, ACUTO O, STORELLI C, MURER H, MÜLLER M, SEMENZA G:
A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes.
Biochim Biophys Acta 1978; 506:136-154.

54. KESSLER M, TANNENBAUM V, TANNENBAUM C:
A simple apparatus for short-time (1-2 seconds) uptake measurements in small volumes; its application to d-glucose transport studies in brush border vesicles from rabbit jejunum and ileum.
Biochim Biophys Acta 1978; 509:348-359.

55. KINNE R, FAUST RG:
Incorporation of d-glucose, l-alanine and phosphate-transport systems from rat renal brush-border membranes into liposomes.
Biochem J 1977; 168:311-314.

56. KINNE R, KINNE-SAFFRAN E:
Isolierung und enzymatische Charakterisierung einer Bürstensaumfraktion der Rattenniere.
Pflugers Arch 1969; 308:1-15.

57. KINNE R, KIRSTEN R:
Der Einfluß von Aldosteron auf die Aktivität mitochondrialer und cytoplasmatischer Enzyme in der Rattenniere.
Pflugers Arch 1968; 300:244-254.

58. KINNE R, KINNE-SAFFRAN E, THEES M, SACHS G:
Sugar transport by renal plasma membrane vesicles.
J Membr Biol 1975; 21:375-395.

59. KIRCHBERGER MA, MARTIN DG, LEAF A,
SHARP GWG:
The effect of aldosterone on glucose metabolism in toad bladder.
Biochim Biophys Acta 1968; 165:22-31.

60. KIRSTEN E, KIRSTEN R, LEAF A, SHARP GWG:
Increased activity of enzymes of the tricarboxylic acid cycle in response to aldosterone in the toad bladder.
Pflugers Arch 1968; 300:213-225.

61. KIRSTEN E, KIRSTEN R, SHARP GWG:
Effects of sodium stimulating substances on enzyme activities in the toad bladder.
Pflugers Arch 1970; 316:26-33.

62. KIRSTEN E, SEGER W, NELSON K, KIRSTEN R:
Study on the properties of mitochondria from rat kidney cortex and red medulla.
In: SCHMIDT U, DUBACH UC (Eds.): Renal metabolism in relation to renal function. Bern: Huber, 1976.

63. KIRSTEN R:
Unveröffentlichte Ergebnisse.

64. KIRSTEN R, BRINKHOFF B, KIRSTEN E:
Increase of cytochromes a and a_3 in rat kidney mitochondria in response to administration of aldosterone in vivo.
Pflugers Arch 1970; 314:231-239.

65. KIRSTEN R, KIRSTEN E:
Redox-state of pyridin-nucleotides in renal response to aldosterone.
Am J Physiol 1972; 223:229-235.

66. KIRSTEN R, KLÖPPEL U, NELSON K, SCHNEIDER M:
Investigation of the low cortico-papillary gradient in the Brattleboro rat kidney - an enzyme and electron microscopic study.
In: MOREL F (Ed.): Biochemistry of kidney functions. INSERM Symp 21. Amsterdam: Elsevier, 1982:195-204.

67. KIRSTEN R, NELSON K, RÖSCHENDORF U, SEGER W, SCHOLZ T, KIRSTEN E:
Effects of aldosterone on lipid metabolism and renal oxygen consumption in the rat.
Pflugers Arch 1977; 368:189-194.

68. KOEFOLD-JOHNSEN V, USSING HH:
The nature of the frog skin potential.
Acta Physiol Scand 1958; 42:298-308.

69. KOSICKI GW, SRERE PA:
Kinetic studies on the citrate-condensing enzyme.
J Biol Chem 1961; 236:2560-2565.

70. LEAF A, MacKNIGHT ADC:
The site of the aldosterone induced stimulation of sodium transport.
J Steroid Biochem 1972; 3:237-245.

71. LIENERT GA:
Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik.
Meisenheim: Hain, 1973.

72. LIPTEN P, EDELMAN IS:
Effects of aldosterone and vasopressin on electrolytes of toad bladder epithelial cells.
Am J Physiol 1971; 221:733-741.

73. LOEB RF, ATCHLEY DW, BENEDICT EM, LELAND L:
Electrolyte balance in adrenalectomized dogs with particular reference to the excretion of sodium.
J Exp Med 1933; 57:775-792.

74. LUDENS JH, FANESTIL DD:
Studies on cytosol aldosterone binding macromolecules.
Biochim Biophys Acta 1971; 244:360-371.

75. LUDENS JH, FANIL DD:
The mechanism of aldosterone function.
Pharmac Ther B 1976; 2:371-412.

76. LUDENS JH, HOOK JB, WILLIAMSON HE:
Lack of effect of actinomycin D on aldosterone induced antinatriuresis when administered after the hormone.
Proc Soc Exp Biol Med 1967; 124:539-541.

77. MARVER D:
Aldosterone action in target epithelia.
Vitam Horm 1980; 38:55-117.

78. MARVER D, GOODMAN D, EDELMAN IS:
Relationships between renal cytoplasmic and nuclear aldosterone-receptors.
Kidney Int 1972; 1:210-223.

79. MARVER D, STEWART J, FUNDER JW, FELDMAN D, EDELMAN IS:
Renal aldosterone receptors: Studies with ^{3}H-aldosterone and the anti-mineralocorticoid ^{3}H-spirolactone (SC 26304).
Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71:1431-1435.

80. MAUSHART R:
Konzept und Technik moderner Kontaminationsmonitore.
Medizinische Physik 1978; 1978:65-72.

81. MILLER D, CRANE RK:
The digestive function of the epithelium of the smal intestine. II. Localization of disaccharide hydrolysis in the isolated brush border portion of intestinal epithelial cells.
Biochim Biophys Acta 1961; 52:293-298.

82. MORRIS DJ, McDERMOTT M, LATIF SA, KEATING A, KENYON CJ:
The metabolism of aldosterone in target tissues.
J Steroid Biochem 1981; 15:473-477.

83. MURER H, HOPFER U, KINNE R:
Sodium/proton antiport in brush-border membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney.
Biochem J 1976; 154:597-604.

84. MURER H, KINNE R:
The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes.
J Membr Biol 1980; 55:81-95.

85. NICHOLSON TF:
A comparison of the effects of proximal and distal tubular damage on the action of deoxycorticosterone and aldosterone.
Can J Biochem 1957; 35:641-644.

86. OHNESORGE J, HOLM R:
Rasterelektronenmikroskopie.
Stuttgart: Thieme, 1973.

87. PELLETIER M, LUDENS JH, FANESTIL DD:
The role of aldosterone in active sodium transport.
Arch Intern Med 1972; 129:248-257.

88. PETERS WHM, DePONT JJHHM, KOPPERS A,
BONTING SL:
Studies on Na-K-activated ATPase. XLVII. Chemical composition, molecular weight and molar ratio of the subunits of the enzyme from rabbit kidney outer medulla.
Biochim Biophys Acta 1981; 641:55-70.

89. PETTY KJ, KOKKO JP, MARVER D:
Secondary effect of aldosterone on Na-K-ATPase activity in the rabbit cortical collecting tubule.
J Clin Invest 1981; 68:1514-1521.

90. QUIGLEY JP, GOTTERER GS:
Distribution of Na-K-stimulated ATPase activity in rat intestinal mucosa.
Biochim Biophys Acta 1969; 173:456-468.

91. QUIGLEY JP, GOTTERER GS:
A comparison of the Na-K-ATPase activities found in isolated brush border and plasma membrane of the rat intestinal mucosa.
Biochim Biophys Acta 1972; 255:107-113.

92. REIMER L, PFEFFERKORN G:
Raster-Elektronenmikroskopie.
Berlin: Springer, 1977.

93. ROELOFSEN B, Van LINDE-SIBENIUS TRIP M:
The fraction of phosphatidylinositol that activates the Na-K-ATPase in rabbit kidney microsomes is closely associated with the enzyme protein.
Biochim Biophys Acta 1981; 647:302-306.

94. ROUSSEAU G, CRABBE J:
Effects of aldosterone on RNA and protein synthesis in the toad bladder.
Eur J Biochem 1972; 25:550-559.

95. SACKTOR B:
The brush border of the renal proximal tubule and the intestinal mucosa
In: JAMIESON GA (Ed.): Mammalian cell membranes, IV. London: Butterworth; 1977:221-254.

96. SACKTOR B:
Transport in membrane vesicles isolated from the mammalian kidney and intestine.
In: SANADI R (Ed.): Current topics in bioenergetics, 8. New York: Academic Press, 1977:39-81.

97. SCHMIDT U, DUBACH UC:
Activity of Na-K-stimulated triphosphatase in the rat nephron.
Pflugers Arch 1969; 306:219-226.

98. SCHMIDT U, HORSTER M:
Na-K-activated ATPase: activity maturation in rabbit nephron segments dissected in vitro.
Am J Physiol 1977; 233:F55-F60.

99. SCHNEIDER V:
Rasterelektronenmikroskopie in Gerichtsmedizin und Kriminalistik.
Pressedienst Wissenschaft der FU Berlin 1974; 2:101-111.

100. SCHOLER DW, MISHINA T, EDELMAN IS:
Distribution of aldosterone receptors in rat kidney cortical tubules enriched in proximal and distal segments.
Am J Physiol 1979; 237:F360-F366.

101. SCHWARTZ GJ:
Na^+-dependent H^+-efflux from proximal tubule: Evidence for reversible Na^+-H^+ exchange.
Am J Physiol 1981; 241:F380-F385.

102. SEGER W:
Mitochondrienpopulationen in der Rattenniere.
Medizinische Inauguraldissertation, Freie Universität Berlin, 1977.

103. SEJERSTED OM, LIE M, KIIL F:
Effect of ouabain on metabolic rate in renal cortex and medulla.
Am J Physiol 1971; 220:1488-1493.

104. SHARP GWG, LEAF A:
Biological action of aldosterone in vitro.
Nature 1964; 202:1185-1188.

105. SHARP GWG, LEAF A:
Mechanism of action of aldosterone.
Physiol Rev 1966; 46:593-633.

106. SKOU JC:
Enzymatic basis for active transport of Na^+ und K^+ across cell membranes.
Physiol Rev 1965; 45:596-617.

107. SKRIVER E, MAUNSBACH AB, JØRGENSEN PL:
Formation of two-dimensional crystals in pure membrane-bound Na-K-ATPase.
FEBS Lett 8/1981; 131(2).

108. SLACK EN, LIANG CCT, SACKTOR B:
Transport of l-proline and d-glucose in luminal (brush border) and contraluminal (basal-lateral) membrane vesicles from the renal cortex.
Biochem Biophys Res Commun 1977; 77:891-898.

109. SNART RS:
The two stage nature of the aldosterone response.
J Steroid Biochem 1972; 3:129-136.

110. SNART RS, TAYLOR E:
Aldosterone effects on renal metabolism.
J Physiol 1978; 274:447-454.

111. SOLYOM A, TRAMS EG:
Enzyme markers in characterization of isolated plasma membranes.
Enzyme 1972; 13:329-372.

112. SONNENBLICK EH, CANNON PJ, LARAGH JH:
The nature of the action of intravenous aldosterone: Evidence for a role of the hormone in urinary dilution.
J Clin Invest 1961; 40:903-913.

113. SRERE PA:
Citryl-CoA and the citrate-condensing enzyme.
Biochim Biophys Acta 1963; 77:693-696.

114. SRERE PA:
Palmityl-Coenzyme A inhibition of the citrate-condensing enzyme.
Biochim Biophys Acta 1965; 106:445-455.

115. SRERE PA, KOSICKI GW:
The purification of citrate-condensing enzyme.
J Biol Chem 1961; 236:2557-2559.

116. STANTON BA, GIEBISCH G:
Effects of pH on potassium transport by renal distal tubule.
Am J Physiol 1982; 242:F544-F551.

117. STECK TL, STRAUS JH, WALLACH DFH:
A model for the behavior of vesicles in density gradients: Implications for fractionation.
Biochim Biophys Acta 1970; 203:385-393.

118. THUNEBERG L, ROSTGAARD J:
Isolation of brush border fragments from homogenates of rat and rabbit kidney cortex.
Exp Cell Res 1968; 51:123-140.

119. UHLICH F, HALBACH R, ULLRICH K:
Einfluß von Aldosteron auf den Ausstrom markierten Natriums aus den Sammelrohren der Ratte.
Pflugers Arch 1970; 320:261-264.

120. WADE JB, O'NEIL RG, TRYOR JL, BOULPAEP EL:
Modulation of cell membrane area in renal collecting tubules by corticosteroid hormones.
J Cell Biol 1979; 81:439-445.

121. WALDEYER A:
Anatomie des Menschen.
Berlin: DeGruyter 1969.

122. WALLRAFF J:
Histologie des Menschen.
München: Urban & SChwarzenberg, 1972.

123. WALTER H:
Tightness and orientation of vesicles from guinea-pig kidney estimated from reactions of adenosine triphosphatase dependent on sodium and potassium ions.
Eur J Biochem 1975; 58:595-601.

124. WARD PE, ERDÖS EG, GEDNEY CD, DOWBEN RM, REYNOLDS RC:
Isolation of membrane-bound enzymes that metabolize kinins and angiotensins.
Biochem J 1976; 157:643-650.

125. WARNOCK DG, EVELOFF J:
NaCl entry mechanisms in the luminal membrane of the renal tubule.
Am J Physiol 1982; 242:F561-F574.

126. WIEDERHOLT M, STOLTE H, BRECHT JP, HIERHOLZER K:
Mikropunktionsuntersuchungen über den Einfluß von Aldosteron, Cortison und Dexamethason auf die renale Natriumresorption adrenalektomierter Ratten.
Pflugers Arch 1966; 292:316-333.

127. WILFONG RF, NEVILLE DM:
The isolation of a brush border membrane fraction from rat kidney.
J Biol Chem 1970; 245:6106-6112.

128. WILLIAMSON HE:
Mechanism of the antinatriuretic action of aldosterone.
Biochem Pharmacol 1963; 12:1449-1450.

129. WRIGHT SH, KIPPEN I, WRIGHT E:
Stoichiometry of Na-succinat cotransport in renal brush-border membranes.
J Biol Chem 1982; 257:1773-1778.

8. ANHANG

Tabellen:

Tab. 1: Gewichte aufeinander folgender '100 µl'-Portionen von Aqua dest. bei drei Pipettierreihen mit der Inkubations-Hamilton-Spritze (µg)
Tab. 2: Modellrechnung für Strahlenbelastung bei verschiedenen Aktivitätsmengen von Na-22
Tab. 3: Na^+/K^+-Quotienten im Rattenurin
Tab. 4 A: Alkalische Phosphatase, spezif. Aktivitäten
Tab. 4 B: Alkalische Phosphatase, Gesamtaktivitäten
Tab. 5 A: Saure Phosphatase, spezif. Aktivitäten
Tab. 5 B: Saure Phosphatase, Gesamtaktivitäten
Tab. 6 A: Lactat-Dehydrogenase, spezif. Aktivitäten
Tab. 6 B: Lactat-Dehydrogenase, Gesamtaktivitäten
Tab. 7 A: Glucose-6-Phosphatase, spezif. Aktivitäten
Tab. 7 B: Glucose-6-Phosphatase, Gesamtaktivitäten
Tab. 8 A: Citrat-Synthase, spezif. Aktivitäten
Tab. 8 B: Citrat-Synthase, Gesamtaktivitäten
Tab. 9 A: Gesamt-ATPase, spezif. Aktivitäten
Tab. 9 B: Gesamt-ATPase, Gesamtaktivitäten
Tab. 10 A: Mg^+-ATPase, spezif. Aktivitäten
Tab. 10 B: Mg^+-ATPase, Gesamtaktivitäten
Tab. 11 A: Na^+-K^+-ATPase, spezif. Aktivitäten
Tab. 11 B: Na^+-K^+-ATPase, Gesamtaktivitäten

Abbildungen:

Abb. 1: Filtriergerät mit 24 Einsätzen für Millipore-Filter
Abb. 2: Inkubationsmethode Minutenbereich
Abb. 3: Inkubationsmethode Sekundenbereich

Abb. 4: Untersuchung der Durchmischung einer Inkubationslösung von Methylrot und Aqua dest. in der Hamilton-Spritze in Abhängigkeit vom auspipettierten Volumen.
Abb. 5: Korrelationsdiagramm einer vergleichenden Zählung von 60 Proben im Gamma- und Beta-Zähler.
Abb. 6: Energiespektrum von Na-22 im Gamma-Zähler Berthold Gammaszint BF 5300 (obere Kurve) und Leerwertspektrum des Zählers (untere Kurve).
Abb. 7: Na^+/K^+-Quotienten im Rattenurin
Abb. 8: Bürstensaum des Nierentubulus der Ratte, REM 5000x
Abb. 9: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere, REM 1000x
Abb. 10: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere, REM 2000x
Abb. 11: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere, REM 10000x
Abb. 12: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere, TM 10000x
Abb. 13: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere, TM 20000x
Abb. 14: Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere, TM 40000x
Abb. 15: Triton-X-100-behandelte Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere, TM 10000x
Abb. 16: Triton-X-100-behandelte Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere, TM 20000x
Abb. 17: Triton-X-100-behandelte Bürstensaummembranvesikel der Rattenniere, TM 40000x
Abb. 18: Intravesikale Na^+-Aufnahme in Membranvesikel der Aldosterongruppe und der Kontrollgruppe, pH 7,4/7,5/7,5
Abb. 19: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel nicht adrenalektomierter, unbehandelter Ratten, pH 7,4/7,5/7,5
Abb. 20: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel der Aldosterongruppe und der Kontrollgruppe unter verschiedenen pH-Bedingungen
Abb. 21: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel normaler unbehandelter Ratten unter verschiedenen pH-Bedingungen
Abb. 22: Mittlere intravesikale Na^+-Aufnahmewerte bei verschiedenen pH-Stufen - Übersicht
Abb. 23: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel normaler unbehandelter Ratten, 25°C/0°C

Abb. 24: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel normaler Rattennieren im Vergleich zur Na^+-Aufnahme Triton-X-behandelter Membranvesikel, pH 5,5/7,5/7,5

Abb. 25: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel normaler Rattennieren im Vergleich zur Na^+-Aufnahme Triton-X-behandelter Membranvesikel, pH 7,4/7,5/8,2

Abb. 26: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel der Aldosterongruppe und der Kontrollgruppe im Vergleich zur Na^+-Aufnahme in Triton-X-behandelte Membranvesikel der Aldosterongruppe und der Kontrollgruppe, pH 7,4/7,5/7,5

Abb. 27: Na^+-Aufnahme in Membranvesikel der Aldosterongruppe und der Kontrollgruppe im Vergleich zur Na^+-Aufnahme in Triton-X-behandelte Membranvesikel der Aldosterongruppe und der Kontrollgruppe, pH 7,4/6,0/7,5

LEBENSLAUF

Am 02.12.1952 wurde ich als letztes von vier Kindern der Eheleute Berta Reiser, geb. Gareis, und Hermann Reiser in Bamberg geboren. Da mein Vater, der Gymnaisiallehrer war, nach Augsburg versetzt wurde, zog die Familie 1953 dorthin. Hier verbrachte ich meine Kindheit und Jugend, besuchte 1959 bis 1963 die Volksschule Am Roten Tor, 1963 bis 1972 das Neusprachliche Gymnasium A.B. von Stettensches Institut. Im Sommer 1972 legte ich die Reifeprüfung ab und nahm im gleichen Jahr das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität in München auf. 1976 wechselte ich an die Freie Universität Berlin, wo ich Ende 1979 die Approbation als Ärztin erlangte. Februar 1980 bis März 1981 arbeitete ich als Assistenzärztin in der Urologischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses zu Berlin. Im März 1981 wechselte ich auf dem Versetzungsweg an die II.Innere Abteilung des Wenckebach-Krankenhauses zu Berlin, wo ich seitdem als Assistenzärztin tätig bin. Seit August 1983 bin ich am Berliner Psychoanalytischen Institut Karl-Abraham-Institut in Ausbildung.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 15.01.1953 als zweites von drei Kindern der Eheleute Reinhold und Veronika Weber in München geboren. Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Grundschule in Neukeferloh und Haag und wechselte dann auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Luitpold-Gymnasium in München. Das 12.Schuljahr verbrachte ich dank eines Stipendiums des American Field Service an der W.T.Woodson High School in Fairfax/USA. Nach dem Abitur 1972 nahm ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München auf und setzte es ab 1976 an der Freien Universität Berlin fort. Nach dem Praktischen Jahr und anschließendem Staatsexamen erhielt ich am 04.12.1979 die Approbation als Arzt.

Vom 01.02.-31.03.1980 arbeitete ich als Assistenzarzt im Albrecht-Achilles-Krankenhaus von Berlin-Wilmersdorf. Seit 01.04.1980 bin ich Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Anästhesiologie des Klinikums Charlottenburg der Freien Universität Berlin.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen